

**Papel de Cdc7 en la regulación de la recombinación homóloga durante
la tolerancia a daños replicativos**

Trabajo realizado en el Departamento de Biología Molecular, CABIMER y en el
Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado
de Doctor en Biología por la Lda. María José Cabello Lobato.

Sevilla, Mayo 2016

La doctoranda,



M^a José Cabello Lobato

El director de tesis,



José Félix Prado Velasco

El tutor,



Ralf Wellinger

“Una cierta oscuridad es necesaria para ver las estrellas”

Osho

Me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho que este trabajo sea posible y sin los cuales nada hubiera sido igual.

A Félix, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis. Por haber confiado en mí, por haberme guiado a lo largo de estos años, por su pasión por la ciencia y por supuesto, por su perseverancia y por haberme mantenido motivada.

A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio. A todos los RWs con los que ha sido un placer compartir el laboratorio: a M^a Carmencita por ser tan especial, a Néstor porque el laboratorio no hubiera sido igual sin él, a Ruth por ser un placer tenerla cerca, a Migue por sus puntos de vista, a Hayat por ser un encanto de persona y a Eli por comprendernos tan bien. A Marta y Román, por haber tenido la paciencia para enseñarme y por el buen ambiente que crearon en el laboratorio. A Ana porque seguramente no hay mejor madre y postdoc de la que se pueda aprender. A Marina, por haber tenido la suerte de compartir todos estos años trabajando juntas, por todas las dudas que hemos compartido y por todos los momentos buenos. A Macarena por haber vuelto con toda su energía al lab. A Maribel por haberme ayudado tanto al final. A Marta porque ha sido un placer tenerla como compi. A Juan María, por todas sus ganas y por todas las risas. Y a todos los que han pasado por el laboratorio durante estos años y han formado parte de la familia.

A todos mi compañeros del Departamento de Biología Molecular (Epigen, REC y FMC) y con los que no compartimos pasillo pero forman parte de la familia (PHs, FCL y SC3). En especial a Marta, por ser tan especial, a Javi por siempre tener una sonrisa y a Curro por ser tan buena persona.

A los servicios de apoyo del CABIMER, en especial a cocina y a Cristina, por estar siempre dispuestas a ayudar en todo lo necesario.

A todos mi Biotecs (Ana, Cristina, Eva, Isa, Juan, Soraya y Pilar), porque este camino lo empezamos juntos en la UPO (con la papaína) y tuve la suerte de poder compartir tantos buenos momentos con vosotros. Por haber tenido la suerte de compartir estos años Ana y Juan, y aunque al resto no las tengo tan cerquita, siempre formareis parte de mi familia.

A mi hermana, por haber estado tan pendiente estos años de mí, gracias por estar conmigo.

A Antonio, por compartir la vida conmigo y por supuesto estar siempre dispuesto a “esperarme”.

En especial a mis padres, porque gracias a su amor y a su sacrificio he podido llegar hasta aquí. Gracias por vuestro apoyo y por dárme todo.

Índice general

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 La replicación del ADN | 3 |
| 1.1.1 Activación de orígenes de replicación | 4 |
| 1.1.2 Regulación de la iniciación de la replicación | 7 |
| 1.1.3 La paradoja de los MCM2-7..... | 8 |
| 1.2 Ensamblaje de la cromatina durante la replicación | 9 |
| 1.3 Mecanismos de control o “checkpoints” | 11 |
| 1.3.1 Checkpoint de daños en el ADN | 11 |
| 1.3.2 El checkpoint replicativo | 13 |
| 1.3.2.1 Mantenimiento de la integridad de las horquillas replicativas | 14 |
| 1.3.2.2 Inhibición de los orígenes de replicación tardíos | 16 |
| 1.3.2.3 Inhibición de la HR | 16 |
| 1.4 Mecanismos de reparación de daños en el ADN: la recombinación homóloga | 17 |
| 1.4.1 Reparación de DSBs por HR | 17 |
| 1.4.2 Regulación de la HR durante el ciclo | 18 |
| 1.5 Tolerancia a daño en el ADN | 19 |
| 1.6 Objetivos | 26 |
| | |
| 2. RESULTADOS: PARTE 1 | 27 |
| 2.1 Rad51 y Rad52 interaccionan con MCM2-7 en <i>S. cerevisiae</i> | 29 |
| 2.2 La actividad quinasa de Cdc7 promueve la interacción de Mcm4 con Rad51 y Rad52 | 30 |
| 2.3 MCM2-7, Rad51 y Rad52 presentan cinéticas similares de unión a la cromatina durante el ciclo celular | 32 |
| 2.4 La acumulación de Rad51 en la cromatina en G1 es independiente de MCM2-7 | 33 |
| 2.5 MCM2-7, Rad51 y Rad52 se mantienen en la cromatina en respuesta a daños..... | 36 |
| replicativos por MMS | 34 |
| 2.6 Las interacciones entre MCM2-7 y Rad51/Rad52 son necesarias para unión a la cromatina en presencia de daño replicativo | 35 |
| 2.7 El defecto de <i>cdc7-4</i> en la unión de Rad52 a la cromatina dañada no está asociado a problemas replicativos | 40 |
| 2.8 El papel de Cdc7 en HR es independiente de sus funciones en el checkpoint y en | |

| | |
|--|-----------|
| TLS | 41 |
| 2.9 La fosforilación de las serinas 164 y 170 de Mcm2 mediada por Cdc7 es necesaria para la unión de Rad52 a las lesiones replicativas en el ADN | 42 |
| 2.10 Cdc7 no regula la unión de Rad52 a la horquilla replicativa..... | 44 |
| 2.11 Cdc7 es necesario para la formación de SCJs inducidas por MMS | 44 |
| 2.12 Cdc7 es necesario para la reparación recombinacional inducida por MMS | 46 |
| 3. RESULTADOS: PARTE 2 | 51 |
| 3.1 Asf1 es necesario para la unión de Rad52 al daño replicativo | 53 |
| 3.2 El papel de Asf1 en la unión de Rad52 al daño replicativo es independiente de su función en la deposición de histona de nueva síntesis | 54 |
| 3.3 La unión de Rad52 al daño replicativo es independiente de la ruta de DDT mediada por acetilación de H3K56 y Rtt101 | 55 |
| 3.4 Papel del reciclaje de histonas parentales en la unión de Rad52 al daño Replicativo | 57 |
| 3.5 Rad53 y Asf1 regulan la unión de Rad52 al daño replicativo mediante mecanismos independientes | 57 |
| 4. DISCUSIÓN | 59 |
| 4.1 Rad51 y Rad52 muestran cinéticas de unión a la cromatina similares a las de la helicasa MCM2-7 | 61 |
| 4.2 La actividad quinasa de Cdc7 promueve la interacción de Rad51 y Rad52 con los complejos helicasa MCM2-7 que no están en la horquilla | 62 |
| 4.3 La interacción de Rad51 y Rad52 con el exceso de helicasas MCM2-7 promueve su unión a los daños replicativos | 63 |
| 4.4 La carga de las proteínas de HR está separada temporalmente de su activación .. | 64 |
| 4.5 La fosforilación de S164 y S170 de Mcm2 mediada por Cdc7 regula la unión de Rad52 a las lesiones replicativa en el ADN | 65 |
| 4.6 Cdc7 es necesario para la reparación recombinacional durante la DDT | 66 |
| 4.7 Asf1 y Rad53 regulan la unión de Rad52 al daño replicativo | 67 |
| 5. CONCLUSIONES | 69 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 73 |

| | |
|---|----|
| 6.1 Estirpes | 75 |
| 6.2 Plásmidos | 79 |
| 6.3 Medios y condiciones de crecimiento | 79 |
| 6.4 Transformación de células | 80 |
| 6.4.1 Transformación de células | 80 |
| 6.4.2 Transformación de levaduras | 80 |
| 6.5 Sincronización de cultivos de levaduras | 80 |
| 6.6 Análisis de viabilidad y sensibilidad a daños en el ADN | 81 |
| 6.7 Extracción de ADN genómico | 81 |
| 6.7.1 Extracción estándar para southern blot , PCR y ChEC | 81 |
| 6.7.2 Extracción para análisis de intermediarios replicativos por 2D/ChEC | 81 |
| 6.7.3 Extracción con columnas de intercambio aniónico | 82 |
| 6.8 Análisis de reclutamiento de proteínas al ADN mediante corte endógeno de cromatina (ChEC) | 83 |
| 6.9 Análisis en geles bidimensionales | 83 |
| 6.9.1 Restricción de ADN | 83 |
| 6.9.2 Electroforesis bidimensional | 83 |
| 6.10 Análisis de fragmentos de ADN por southern blot | 84 |
| 6.10.1 Transferencia alcalina de ácidos nucleicos a membranas | 84 |
| 6.10.2 Hibridación de ADN | 84 |
| 6.10.3 Cuantificación de señales | 85 |
| 6.11 Análisis de proteínas | 85 |
| 6.11.1 Extracción de proteínas | 85 |
| 6.11.2 Fraccionamiento de cromatina | 85 |
| 6.11.3 Coinmunoprecipitación | 86 |
| 6.11.4 Detección de proteínas mediante western blot | 86 |
| 6.12 Ensayo de actividad quinasa <i>in situ</i> | 88 |
| 6.13 Citometría de flujo | 88 |
| 6.14 Análisis de células con gema | 88 |
| 6.15 Análisis de focos de Rad52-YFP y Rfa1-YFP | 89 |
| 6.16 Ensayos de recombinación genética | 89 |
| 6.17 Ensayos de mutagénesis | 89 |
| 6.18 PCR cuantitativa | 90 |
| 6.19 Oligos | 90 |

| | |
|---|-----------|
| 7. APÉNDICES | 93 |
| 7.1 Medios | 95 |
| 7.1.1 Medios de bacterias..... | 95 |
| 7.1.2 Medios de levaduras | 95 |
| 7.2 Antibióticos, drogas, enzimas e inhibidores | 95 |
| 7.2.1 Antibióticos | 96 |
| 7.2.2 Drogas e inhibidores | 96 |
| 7.2.3 Enzimas | 96 |
| 7.3 Tampones | 97 |
| | |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 99 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| 1.1. Iniciación de la replicación | 5 |
| 1.2. Dinámica de la deposición de histonas en la horquilla replicativa | 10 |
| 1.3. Mecanismos de checkpoint de daños en el ADN | 12 |
| 1.4. Formación del filamento de Rad51 | 18 |
| 1.5. Progresión de la horquilla y relleno de los huecos tras una lesión en la cadena líder o la retrasada | 20 |
| 1.6. Regulación de las rutas de DDT por PCNA | 21 |
| 1.7. Mecanismos de TS durante la fase S..... | 23 |
| | |
| 2.1. Mcm4 interacciona con Rad51 y Rad52 | 29 |
| 2.2. La interacción de Mcm4 y Rad51 es independiente de daño | 30 |
| 2.3. La interacción de Mcm4 y Rad51 depende de la actividad quinasa de Cdc7 | 31 |
| 2.4. MCM2-7, Rad51 y Rad52 tienen cinéticas de unión a la cromatina similares | 32 |
| 2.5. La acumulación en la cromatina de Rad51 en G1 es independiente de MCM2-7 | 33 |
| 2.6. La acumulación de Mcm4-GFP y Rad51 en G1 depende de la actividad quinasa de Cdc7..... | 34 |
| 2.7. MCM2-7 y Rad51 tienen cinéticas de unión a la cromatina similares en presencia de MMS | 35 |
| 2.8. La integridad del complejo MCM2-7/Rad51/Rad52 es necesaria para el Mantenimiento de estos factores en la cromatina replicada en presencia de MMS..... | 36 |
| 2.9. Cdc7 es necesario para la unión de Rad52 a las lesiones replicativas en el ADN | 37 |
| 2.10. <i>cdc7-4</i> no presenta problemas replicativos a temperatura semipermissiva | 38 |
| 2.11. <i>cdc-4</i> es defectivo en la activación de Rad53 y en mutagénesis inducida por MMS a temperatura semipermissiva | 39 |
| 2.12. <i>cdc7-4</i> afecta a la interacción entre MCM2-7 y Rad52 a temperatura semipermissiva | 40 |
| 2.13. El papel de Cdc7 en la unión de Rad52 no está asociado con defectos replicativos | 41 |
| 2.14. El papel de Cdc7 en la unión de Rad52 al daño replicativo es independiente de sus funciones en checkpoint y TLS | 42 |
| 2.15. <i>mcm2_{AA}</i> no afecta a la frecuencia de mutagénesis inducida por MMS | 42 |
| 2.16. La fosforilación de las serinas 164 y 170 de Mcm2 por Cdc7 es necesaria para la unión de Rad52 al daño replicativo..... | 43 |
| 2.17. Cdc7 no regula la unión de Rad52-MN a la horquilla replicativa | 44 |
| 2.18. Cdc7 es necesario para la formación de SCJs inducidas por MMS | 45 |
| 2.19. <i>mcm2_{AA}</i> no afecta a la formación de SCJs inducidas por MMS..... | 45 |
| 2.20. <i>cdc7-4</i> es defectivo en la reparación recombinacional de las lesiones replicativas | 46 |
| 2.21. La actividad quinasa de Cdc7 es necesaria para la recombinación homóloga inducida por MMS durante la fase S y G2/M | 48 |
| 2.22. <i>mcm2_{AA}</i> no es defectivo en reparación recombinacional inducida por MMS | 49 |
| 2.23. <i>cdc7-4</i> es resistente a MMS y es proficiente en recombinación genética | 50 |
| | |
| 3.1. Asf1 es necesaria para la unión de Rad52 a los daños replicativos | 53 |
| 3.2. Asf1 es necesaria para la formación de SCJs inducidas por MMS | 54 |
| 3.3. CAF1 y Rtt106 afectan a la unión de Rad52 a la cromatina en ausencia de daños..... | 55 |

| | |
|---|----|
| 3.4. La acetilación de H3K56 no regula la unión de Rad52 al daño replicativo | 56 |
| 3.5. La ruta mediada por Rtt101 no es necesaria para la unión de Rad52 al daño replicativo..... | 56 |
| 3.6. La interacción de Asf1 con las histonas no es necesaria para la regulación de la unión de Rad52 al daño replicativo..... | 57 |
| 3.7 Rad53 regula la unión de Rad52 al daño replicativo de manera independiente a Asf1 .. | 58 |
| | |
| 4.1. Modelo de regulación de la HR durante la DDT | 64 |
| 4.2. Modelo especulativo de regulación de la HR durante la DDT..... | 67 |
| | |
| 6.1. Representación esquemática de los procesos de construcción de estirpes basados en recombinación homóloga | 78 |

ABREVIATURAS

ChEC: corte endógeno de la cromatina

CDK: quinasa dependiente de ciclina

CMG: Cdc45-MCM2-7-GINS

DSB: cortes de doble cadena

DDK: quinasa dependiente de Dbf4

DDR: respuesta a daños en el ADN

DDT: tolerancia a daños en el ADN

dsADN: ADN de cadena doble

HR: recombinación homóloga

HJ: unión de Holliday

HU: hidroxiaurea

M-CDKs: ciclinas mitóticas

MMS: metil metano sulfonato

preRC: complejo pre-replicativo

preIC: complejo de pre-iniciación

RNR: ribonucleótido reductasa

SCJ: unión entre cromatidas hermanas

ssADN: ADN de cadena simple

TLS: síntesis translesión

TS: cambio de molde

UV: ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

La respuesta a daños en el ADN (DDR, DNA damage response) es una compleja red de mecanismos cuyo objetivo final es evitar la acumulación de mutaciones y reordenamientos genómicos que comprometen el correcto funcionamiento celular. Entre los principales mecanismos de la DDR se encuentran los puntos de control o “checkpoints”, los mecanismos de reparación y tolerancia de daños y los programas de senescencia celular y apoptosis. En conjunto, esta respuesta funciona como una barrera que previene la inestabilidad genética, y por tanto clave para prevenir el desarrollo del cáncer [1].

La correcta duplicación del ADN es esencial para el mantenimiento de la información genética y la progresión a lo largo del ciclo celular. La horquillas replicativas son estructuras altamente dinámicas y frágiles, tanto por la presencia de fragmentos de ADN de cadena sencilla (ssDNA) como por la descromatinización asociada con la síntesis de ADN, lo que las hace susceptibles de ser sustrato de nucleasas y otras enzimas implicadas en el procesamiento del ADN. Además en cada ciclo celular, numerosos obstáculos generados tanto por agentes endógenos y exógenos que causan lesiones en el ADN (aductos, sitios abásicos o incorporación de ribonucleótidos en vez de nucleótidos) como los propios obstáculos intrínsecos del ADN (zonas altamente compactadas, proteínas unidas, híbridos ADN-ARN, etc.) impiden el avance de la horquilla de replicación y, en algunos casos, llevan al colapso y la rotura de éstas. Por ello, las células han desarrollado diferentes mecanismos implicados en la protección, reparación y reiniciación de las horquillas, y mutaciones en estos mecanismos causan inestabilidad genética y están asociados con cáncer y numerosas enfermedades genéticas. Aunque la complejidad de estos mecanismos aumenta a lo largo de la evolución, los aspectos básicos están muy conservados desde levaduras hasta humanos. En este trabajo hemos utilizado *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo por sus ventajas para la investigación genética y bioquímica.

1.1 La replicación del ADN

Las células eucariotas regulan la replicación de su genoma mediante complejos mecanismos que aseguran la correcta y rápida duplicación de la información genética preservando la estabilidad genómica. La maquinaria de replicación del ADN puede implicar hasta 100 proteínas distintas en una misma horquilla. Muchas de estas proteínas forman el núcleo de la maquinaria de síntesis del ADN, otras acoplan la síntesis de ADN con el ensamblaje de los nucleosomas y la herencia de las marcas epigenéticas, y otro grupo importante monitoriza la integridad de las horquillas y las coordina con el programa de replicación global.

1.1.1 Activación de los orígenes de replicación

La iniciación de la replicación ocurre en dos fases separadas temporalmente y coordinadas con la progresión del ciclo celular. En la primera, se produce la “licencia” de los orígenes de replicación, que consiste en la formación del complejo pre-replicativo (preRC) (Figura 1.1). La formación de este complejo ocurre de manera secuencial desde el final de mitosis hasta el punto “START” en G1. La replicación se inicia en múltiples regiones u orígenes distribuidos a lo largo de los cromosomas. En *S. cerevisiae* los orígenes de replicación son secuencias de ADN específicas conocidas como ARS (Autonomously Replicating Sequences) a las que se encuentra unido de manera constitutiva el complejo de reconocimiento de orígenes (ORC, origin recognition complex) [2, 3]. Al final de mitosis la proteína Cdc6, esencial para el reclutamiento del complejo helicasa MCM2-7 [4, 5], se une a ORC, proceso que además requiere la unión de Cdt1 a MCM2-7 [6, 7]. MCM2-7 es un anillo formado por 6 subunidades dispuestas en el siguiente orden: Mcm3, Mcm5, Mcm2, Mcm6, Mcm4 y Mcm7 [8-10]. Gracias a la hidrólisis de ATP por Cdc6, MCM2-7 se une fuertemente al ADN de doble cadena (dsDNA, double stranded DNA) y lo rodea [6, 11]. Una vez cargado, ORC hidroliza ATP, dando lugar a un cambio conformacional que libera a MCM2-7 del origen de replicación [12-14]. Este ciclo se repite múltiples veces de manera que se cargan aproximadamente entre 5-40 complejos MCM2-7 por cada origen de replicación, los cuales se desplazan por la cromatina [13]. Una vez que los MCM2-7 están cargados en los orígenes, Cdc6 y Cdt1 no son necesarios y se disocian [13, 15]. Tras esta serie de eventos, dos hexámeros MCM2-7 enfrentados e inactivos quedan cargados en los orígenes de replicación (preRCs).

El siguiente paso es la formación del complejo de pre-iniciación (preIC), el cual incluye todas las proteínas necesarias (Sld3, Dbp11, Sld2, Cdc45, la polimerasa ϵ , el complejo GINS y Mcm10) para activar la helicasa como paso previo a la síntesis de ADN [16, 17]. Esta activación ocurre en la transición G1-S y requiere la fosforilación de diferentes componentes del preIC por las quinasas CDK (cyclin-dependent kinase, Cdc28 en *S. cerevisiae*) y DDK (Dbf4-dependent kinase, Cdc7 en *S. cerevisiae*). DDK consiste en dos subunidades, una serina/treonina quinasa codificada por *CDC7* y una unidad reguladora codificada por *DBF4*, siendo ambas esenciales para la viabilidad celular. Las actividades CDK y DDK son necesarias durante toda la fase S para activar los orígenes de replicación [18, 19].

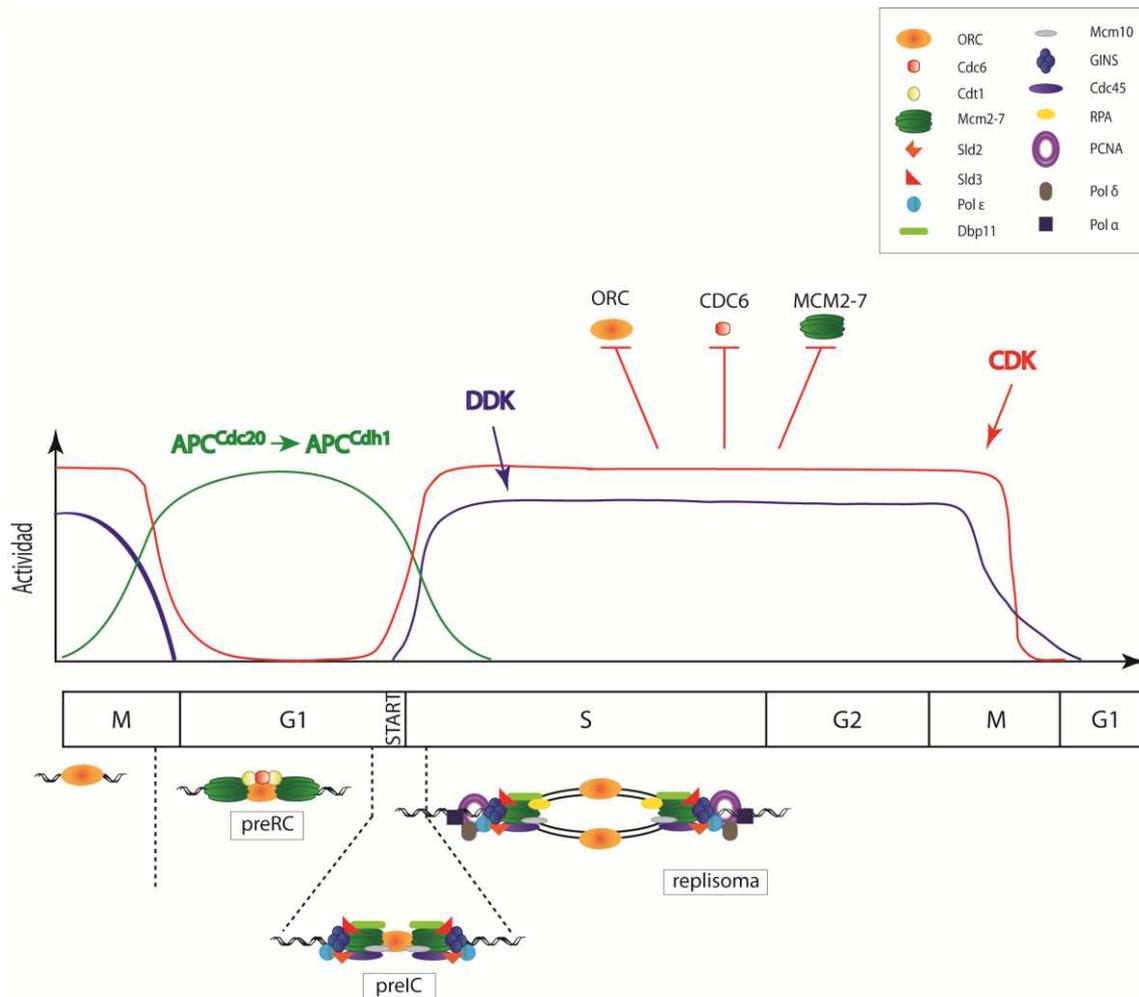


Figura 1.1. Iniciación de la replicación. Los orígenes de replicación son licenciados al final de mitosis y G1 mediante el ensamblaje del complejo de preRC formado por ORC, Cdc6 y MCM2-7/Cdt1 cuando la actividad CDK es baja. El aumento de la actividad CDK y DDK en la transición G1/S favorece la formación del complejo de preIC que contiene todas las proteínas que se ensamblan en los orígenes antes de la síntesis del primer cebador de ARN. La iniciación de la replicación no tiene lugar hasta que las actividades CDK y DDK son altas y activan los preICs. La actividad CDK en las fases S y G2, es también necesaria para inhibir la carga de nuevos preRC, lo que permite separar temporalmente la carga de la activación de los complejos de replicación.

MCM2-7 posee múltiples sitios de fosforilación capaces de modular tanto la iniciación como la progresión de la replicación. La activación de MCM2-7 requiere la fosforilación por Cdc7 de varios residuos del complejo en las subunidades Mcm2, Mcm4 y Mcm6 [20-22], aunque para que esto ocurra, es necesario que el complejo MCM2-7 sea previamente fosforilado por otras quinasas, entre las que se encuentra Mec1 [23]. El dominio N-terminal de Mcm4 contiene varios sitios de fosforilación implicados en la regulación de la progresión a lo largo de la fase S [24, 25]. En concreto, la fosforilación de este dominio por Cdc7 es necesaria para eliminar una función de Mcm4 que inhibe la actividad helicasa del complejo MCM2-7 [22, 24, 26]. Por su parte, la fosforilación de Mcm2 en las serinas 169 y 170 por Cdc7, esencial para

la iniciación de la replicación, reduce la afinidad de Mcm2 por Mcm5, lo que favorece la apertura del anillo y la extrusión de ssDNA *in vitro* [27-29]. La mutación puntual *mcm5-bob1* reduce la afinidad de Mcm2 por Mcm5 [27] y elimina el requerimiento para la iniciación de la replicación tanto de Cdc7 como de la fosforilación de Mcm2-S169-S170 [27, 30, 31]. Se ha propuesto que *mcm5-bob1* genera un cambio estructural en el anillo helicasa que mimetiza el promovido por la fosforilación de MCM2-7 por Cdc7 [31].

Por su parte, la actividad quinasa de Cdc28 regulada por ciclinas de tipo B es necesaria para la activación de otras proteínas que participan en el ensamblaje del replisoma, tales como Sld2 y Sld3 [32-34]. A diferencia de DDK, la fosforilación del complejo MCM2-7 por CDK no es esencial para la iniciación de la replicación, aunque un balance apropiado de las actividades CDK y DDK sobre MCM2-7 es necesario para el correcto ensamblaje del replisoma y su posterior progresión [35].

Mediante un proceso cuyo orden aún no se ha establecido con precisión, Cdc28 y Cdc7 fosforilan a Mcm10, Cdc45, Dbp11 y al complejo GINS durante la formación del preIC. Es probable que la mayoría de las proteínas del complejo se ensamblen simultáneamente, ya que la asociación de unas depende de la presencia de otras. Por ejemplo, la unión de las cuatro subunidades del complejo GINS depende de la unión de Cdc45 y Dpb11, mientras que Cdc45 y Dpb11 no se unen bien en ausencia de GINS. Cada hexámero MCM2-7 se asocia con Cdc45 y GINS para formar el complejo helicasa CMG (Cdc45-MCM2-7-GINS), que junto con Mcm10, Dbp11, Sld2, Sld3 y la polimerasa ϵ forman el preIC [36]. La activación del doble hexámero de MCM2-7 en el preIC conduce a su separación en dos hexámeros independientes. Es importante destacar que mientras que el doble hexámero de MCM2-7 rodea dsADN, el complejo MCM2-7 activo rodea ssDNA [37, 38]. La actividad helicasa del complejo CMG desenrolla el ADN [36, 37, 39], lo cual permite la síntesis de ADN tanto de la cadena líder, la cual se replica de manera continua mediante la actividad de la polimerasa ϵ , como de la cadena retrasada, la cual, se sintetiza de forma discontinua por la actividad de la polimerasa δ generando los fragmentos de Okazaki. Tanto la cadena líder como la retrasada se inician a partir de un cebador inicial de ARN, sintetizado por la polimerasa α (primasa), el cual es extendido inicialmente por esta misma polimerasa. El factor de replicación C (RFC) se une entonces a la unión cebador-molde y cataliza el reclutamiento del factor de procesividad de la replicación PCNA, homotrímero en forma de anillo que rodea al ADN y al que se unen las polimerasas Pol δ y ϵ [40]. Por tanto, la síntesis de ADN en la horquilla replicativa va asociada a una acumulación transitoria de ssDNA que es estabilizado mediante la unión del complejo RPA (replication protein A, formado por Rpa1, Rpa2 y Rpa3). Además de estas proteínas, otros muchos factores se asocian al replisoma y participan en diferentes aspectos de la dinámica de

las horquillas, tales como el procesamiento de los fragmentos de Okazaki (Rad27, Dna2, Lig1), la eliminación de tensión topológica (Top1, Top2), la estabilidad del replisoma (Mrc1, Tof1, Csm3) o la remodelación de la cromatina (FACT, Asf1, CAF-1).

1.1.2 Regulación de la iniciación de la replicación

La estricta separación temporal entre la formación del preRC (G1) y su activación (fase S) asegura que ninguna secuencia sea replicada más de una vez en el mismo ciclo. La actividad CDK es el factor que determina que la célula se encuentre en un estado permisivo o restrictivo para la formación de los preRCs (Figura 1.1). Durante las fases S y G2 la actividad CDK inhibe el ensamblaje de los componentes de los preRCs mediante múltiples rutas. Por ejemplo, la unión de la ciclina Clb5 a ORC y su fosforilación por Cdc28 inhibe la capacidad de ORC de ensamblar nuevos preRCs [41]. Por su parte, la fosforilación dependiente de Cdc28 de Cdc6 en diferentes residuos, los cuales promueven su degradación por el proteasoma y bloquean su capacidad de unión a ORC [42, 43]. Además, la fosforilación de MCM2-7 por CDK promueve su transporte del núcleo al citoplasma [44-46]. De esta manera los niveles de CDK y DDK promueven la activación de los preRCs cargados en G1 a la vez que inhiben la formación de otros nuevos en las zonas ya replicadas.

La salida de mitosis está marcada por la degradación de las ciclinas mitóticas (M-CDKs), las cuales promueven su propia degradación al fosforilar y activar al complejo promotor de la anafase (APC, anaphase promoter complex) unido al cofactor Cdc20 (APC^{Cdc20}) [47]. En consecuencia, la actividad quinasa de CDK cae durante mitosis tardía y G1, permitiendo el ensamblaje de los preRCs. Durante esta fase APC, unido al cofactor Cdh1, promueve la degradación de Dbf4 y por tanto elimina la actividad DDK [48]. De esta manera la célula impide la activación de los preRCs cargados durante la fase G1. En la transición G1/S, cuando el licenciamiento de orígenes ha terminado, el aumento de actividad CDK fosforila a Cdh1, lo que promueve su degradación y el subsecuente aumento de Dbf4 y por tanto de actividad DDK, permitiendo la iniciación de la replicación y la entrada en fase S. Por tanto, la actividad quinasa de Cdc7 es también periódica durante el ciclo celular; es baja durante G1, aumenta en la transición G1/S y se mantiene alta durante las fases S y G2, declinando finalmente en mitosis (Figura 1.1). Esta periodicidad está controlada por CDK y APC que regulan los niveles de Dbf4, siendo los niveles de Cdc7 prácticamente constantes a lo largo del ciclo [48].

Los orígenes de replicación se activan a lo largo de toda la fase S, por lo que en una misma célula las reacciones de iniciación, elongación y terminación ocurren simultáneamente, aunque el número de orígenes que inician la replicación disminuye progresivamente con el

tiempo. Sin embargo, por conveniencia, hablamos de orígenes de replicación tempranos y tardíos, los cuales a su vez pueden ser activados con mayor o menor eficiencia de una manera aparentemente estocástica, de manera que los patrones de replicación varían de célula a célula [49]. Dentro de una población de células, pocos, si es que alguno, de los orígenes son usados de manera constitutiva y la mayoría se activan sólo en una proporción de células [50]. Finalmente, existen los llamados orígenes de replicación durmientes que se replican de forma pasiva desde orígenes vecinos pero que pueden ser activados en condiciones de estrés replicativo si su replicación no se produce. En levaduras, esta activación también requiere la inactivación del checkpoint [51], probablemente para eliminar la inhibición que este proceso ejerce sobre los orígenes tardíos en situaciones de estrés replicativo (Ver 3.2.2) [52].

Como se ha mencionado anteriormente, cada ORC es capaz de reclutar múltiples dobles hexámeros MCM2-7 desde el final de mitosis hasta G1, los cuales se dispersan varias kilobases en el ADN. Por tanto, existe un exceso de complejos MCM2-7 en la cromatina que no colocalizan con horquillas replicativas [53, 54]. Este exceso de complejos MCM2-7 unidos a la cromatina son eliminados durante la replicación conforme la horquilla avanza por la acción de la helicasa Rrm3, la cual progresa con el replisoma [55]. Este mecanismo asegura por un lado el mantenimiento de MCM2-7 en la cromatina en las zonas que aún no han sido replicadas, y por otro su salida de las regiones que ya han sido replicadas.

1.1.3 La paradoja de los MCM2-7

El exceso de MCM2-7 cargados en la cromatina en relación al número de orígenes de replicación se conoce como la paradoja de los MCM2-7. Se ha demostrado que es posible reducir la concentración de complejos MCM2-7 sin alterar la replicación del ADN. En levaduras se ha visto que una reducción del 50% de los niveles de Mcm2 no afecta a la tasa de crecimiento pero sí provoca una disminución en el número de orígenes que son usados durante fase S, indicando que el exceso de MCM2-7 puede ser necesario para que los orígenes de replicación sean capaces de iniciar la replicación exitosamente [56]. En *C. elegans* la disminución de los niveles de Mcm5, Mcm6 o Mcm7 da lugar a problemas de proliferación en presencia de HU [57]. En células humanas, una reducción en los niveles de MCM2-7 unidos a la cromatina de en torno al 70% no afecta a la tasa de replicación ni a la activación de orígenes en condiciones normales; sin embargo, en presencia de estrés replicativo estas células activan menos orígenes de replicación durmientes, progresan más lentamente a través de la fase S y tienen una menor tasa de supervivencia que las células control [58].

Por tanto, el “exceso” de complejos MCM2-7 no es necesario durante una fase S normal pero sí en condiciones de estrés replicativo para la activación de los orígenes de replicación durmientes y el mantenimiento de integridad genómica [57-60]. No obstante, el número de MCM2-7 cargados es superior incluso al necesario para la activación de orígenes durmientes, lo que sugiere que puedan tener otra función aún no definida.

1.2. Ensamblaje de la cromatina durante la replicación

En las células eucariotas el ADN se encuentra empaquetado en una estructura altamente dinámica y especializada denominada cromatina. El nucleosoma, la unidad básica de la cromatina, está formado por 146 pb de ADN enrollado 1.65 veces alrededor de un octámero de histonas. Este octámero está constituido por un tetrámero central formado por 2 heterodímeros de H3/H4 al que se unen 2 heterodímeros H2A/H2B a cada lado del tetrámero [61]. El ensamblaje de la cromatina es un proceso secuencial, donde chaperonas y factores de ensamblaje de la cromatina depositan primero los heterodímeros $(H3/H4)_2$ y posteriormente los dímeros H2A/H2B. Después, tras la deposición, actúan complejos remodeladores dependientes de ATP y complejos modificadores de histonas que establecen las características de la cromatina específicas de cada región [62]. La deposición de histonas y el ensamblaje en nucleosomas ocurren rápidamente detrás de la horquilla, de manera que se exponen tan sólo ~200 pb de ADN.

El ensamblaje de la cromatina durante la fase S está altamente regulado y coordinado con la síntesis de ADN: los nucleosomas son desensamblados delante de la horquilla de replicación y ensamblados mediante el reciclaje de las histonas parentales y la deposición de nuevas histonas (Figura 1.2)[63]. El ensamblaje de los nucleosomas precisa de una estricta coordinación de los componentes del replisoma con chaperonas de histonas, factores de ensamblaje de la cromatina y maquinarias de modificación de los nucleosomas [64, 65]. Por ejemplo, tanto la chaperona de histonas Asf1 como el modelador de la cromatina FACT interaccionan con el complejo MCM2-7 [66-68]. Por otra parte, el factor de ensamblaje de la cromatina CAF-1 y Asf1 interaccionan con PCNA y RFC, respectivamente [69, 70]. Estas interacciones aseguran un correcto acoplamiento entre los procesos de síntesis de ADN y la deposición de histonas, y su desregulación da lugar a inestabilidad genética [71, 72].

La subunidad Mcm2 de la helicasa MCM2-7 desempeña un papel fundamental en el reciclaje y ensamblaje de histonas parentales junto con las chaperonas de histonas Asf1 y FACT [66, 73-76]. De una manera independiente a su función como helicasa, Mcm2 es capaz de unirse a tetrámeros H3/H4, formando un complejo 2:2:2 Mcm2/H3/H4 [67]. La conformación

1:2:2 en la que un Mcm2 se une a un tetrámero H3/H4 también es posible. El complejo 2:2:2 puede ser disrumpido por Asf1, que es capaz de romper el tetrámero H3/H4 [77-79], dando lugar a un complejo 1:1:1:1 Mcm2/H3/H4/Asf1, que puede coexistir con complejos 1:1:1 Asf1/H3/H4. La actividad chaperona de Mcm2 se encuentra en su dominio N-terminal, el cual interacciona con la interfase de H3/H4 que contacta el ADN que envuelve al nucleosoma. Este mecanismo le permite interactuar tanto con la histona H3 canónica como con su variantes [67]. Este dominio es también necesario para la unión de Cdc45 [67], lo que sugiere que Mcm2 juega un papel crítico en la coordinación del reciclaje de H3/H4 con la progresión de la horquilla replicativa.

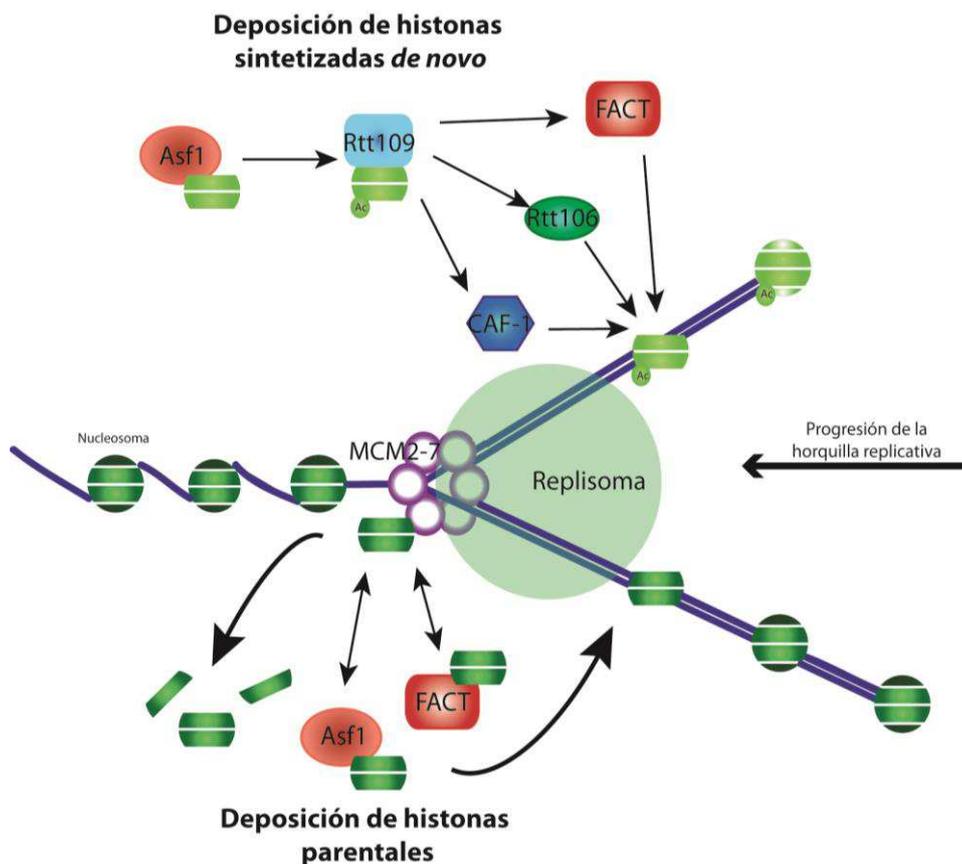


Figura 1.2. Dinámica de deposición histonas en la horquilla replicativa. Durante la deposición de histonas sintetizadas *de novo* los dímeros H3/H4 recién sintetizados se unen a la chaperona Asf1 la cual favorece, mediante acetilaciones mediadas por Rtt109 y otras acetil transferasas, su transferencia a los ensambladores CAF-1, Rtt106 y FACT para su deposición en el ADN recién sintetizado. Las histonas parentales también se reciclan mediante un mecanismo que depende las chaperonas Mcm2, Asf1 y FACT.

Mcm2 también interacciona con FACT [76]. FACT, formado por Spt16 y Pob3, es una chaperona de histonas capaz de unirse a nucleosomas, complejos H3/H4 e histonas libres [80-83]. FACT participa en la reposición de los tetrámeros parentales (H3/H4)₂ detrás de la ARN polimerasa durante la transcripción [84]. Durante la replicación, Mcm2 se une a las histonas cooperativamente con FACT, lo que promueve el reensamblaje de la cromatina. FACT no se asocia con MCM2-7 en G1, si no que es incorporado al replisoma una vez que ha comenzado la replicación [76]. Por tanto, el complejo formado por Mcm2 y FACT, posiblemente con la colaboración de Asf1, parece jugar un papel esencial en la transferencia de las histonas parentales a las cromátidas nacientes tras la horquilla [76].

La incorporación de los dímeros H3/H4 sintetizados *de novo* es llevada a cabo por tres rutas solapantes mediadas por CAF-1, Rtt106 y FACT (Figura 1.2). Corriente arriba de ellas actúa Asf1, la cual se une a los heterodímeros de H3/H4 de nueva síntesis y se los presenta a la acetiltransferasa Rtt109 que acetila la lisina 56 de la histona H3 [85]. La acetilación de H3K56 aumenta la afinidad de H3/H4 con los ensambladores CAF-1 y Rtt106 y de éstos a la cromatina [86]. La transferencia de H3/H4 del complejo Asf1/H3/H4 a CAF-1 está regulada por la E3 ubiquitina ligasa Rtt101, capaz de unirse y ubiquitinar a H3, desestabilizando la interacción entre Asf1 y las histonas [87]. CAF-1 es reclutado al replisoma a través de su interacción con PCNA, la cual está regulada, al menos en humanos, por Cdc7 [88] y junto con FACT y Rtt106 promueven la deposición de los heterodímeros (H3/H4)₂ en las cromátidas nacientes [89-92].

1.3. Mecanismos de control o “checkpoints”

Las células han desarrollado mecanismos de control o “checkpoints” que coordinan la progresión del ciclo celular con la respuesta a problemas en la integridad o dinámica de los cromosomas. Existen tres clases de proteínas de checkpoint según su función: los sensores, los cuales detectan el daño, los transductores o mediadores, que transmiten y amplifican la señal, y los efectores, que median la respuesta fisiológica de la célula [93]. En esta introducción nos centraremos en los checkpoints que detectan problemas específicos de la replicación.

1.3.1 Checkpoint de daños en el ADN

El checkpoint de daños en el ADN actúa durante todo el ciclo celular, retrasando la transición G1/S o bloqueando la salida de G2/M, para evitar la replicación o segregación, respectivamente, de cromosomas dañados [94, 95]. Los sensores principales del checkpoint de

daño son las quinasas de inositol trifosfato Mec1 y Tel1. Mientras que Tel1 es activada principalmente por cortes de doble cadena (DSB, double strand breaks), Mec1 responde a una amplia variedad de daños en el ADN que tienen en común la acumulación de ssDNA generado durante el procesamiento por las maquinarias de reparación y tolerancia de diferentes lesiones, tales como bases dañadas, desapareadas o erróneas, sitios abásicos, distorsiones en el ADN, enlaces covalentes intermoleculares, cortes de cadena sencilla o DSBs (Figura 1.3) [96]. Una fuente importante de DSBs durante la fase S proviene de la rotura de la horquilla de replicación. Cuando se produce un DSB el complejo Mre11/Rad50/Xrs2 (MRX) se une a los extremos del corte y recluta a Tel1 y a la endonucleasa Sae2 [97, 98]. Sae2 inicia la resección de la cadena del extremo 5', proceso que es continuado por la acción de dos rutas independientes; una mediada por la helicasa Sgs1 y la endonucleasa Dna2 y otra por la exonucleasa Exo1 [99-101]. El ssDNA generado es recubierto por RPA, la cual evita la formación de estructuras secundarias en el ADN [102].

El nucleofilamento ssDNA/RPA generado es el sustrato reconocido por el complejo formado por Mec1 y su subunidad reguladora Ddc2 [103]. Sin embargo, esta unión no es suficiente para la activación completa del checkpoint, siendo necesaria la carga por la proteína Rad24 del complejo 9-1-1, un heterotrímero formado por Rad17-Mec3-Ddc1 [104].

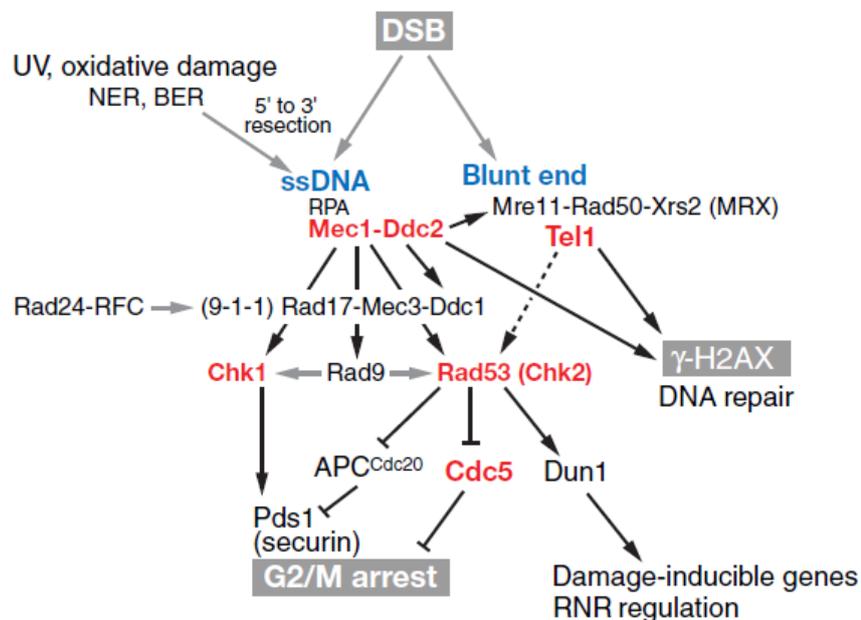


Figura 1.3. Mecanismos de checkpoint de daños en el ADN. La generación de DSBs es detectada por MRX el cual recluta a Tel1. La resección del DSB genera ssDNA que inicia la cascada de activación del checkpoint de daño a partir de Mec1-Ddc2. Mec1 también se activa por otras rutas que generan ssDNA, como el daño replicativo. Las actividades de Mec1 y Tel1, amplificadas por el mediador Rad9, activan a los efectores Rad53 y Chk1, que paran el ciclo celular y regulan la reparación de daño. Adaptado de [105].

Uno de los sustratos de Mec1 y Tel1 es la serina 129 de la histona H2A, la cual se puede extender varias kilobases desde la lesión. Esta modificación promueve el reclutamiento de la proteína mediadora del checkpoint Rad9 [106], la cual transmite y amplifica la señal del checkpoint dando lugar a la activación de las proteínas efectoras Rad53 y Chk1 [107].

La fosforilación de los efectores Rad53 y Chk1 activa distintas respuestas en la célula, siendo la principal la parada del ciclo. En *S. cerevisiae* esta parada se produce en la transición metafase/anafase. Chk1 favorece la estabilización de la securina Pds1 lo que impide la degradación de las cohesinas y por tanto la separación de las cromátidas hermanas [108]. Por su parte, Rad53 inhibe a APC^{Cdc20}, de manera que evita la degradación de Pds1 y de las ciclinas mitóticas [109]. En *S. pombe* y eucariotas superiores la parada se produce en G2 debido a la inhibición por fosforilación de las M-CDKs por la quinasa Wee1 [110]. Estudios recientes han demostrado que este mecanismo funciona también en *S. cerevisiae*, pero es dispensable debido al control adicional de las M-CDKs por Rad53 [111].

Otra función general de Rad53 es la regulación de la expresión de cientos de genes necesarios para los diferentes mecanismos de reparación [112]. En esta respuesta transcripcional destaca la activación por fosforilación de la quinasa Dun1, la cual por un lado activa los genes que codifican a la ribonucleótido reductasa (RNR), factor limitante en la síntesis de dNTPs, y por otro inhibe a Sml1, un inhibidor específico de la RNR. De esta manera Rad53 aumenta los niveles de nucleótidos necesarios para reparar y replicar el ADN [113]. De hecho, la función esencial tanto de Mec1 como de Rad53 es mantener los niveles de nucleótidos necesarios para reparar y replicar el ADN, independientemente de su función en el checkpoint, de tal manera que los mutantes nulos *mec1Δ* y *rad53Δ* son viables en ausencia de Sml1 [114].

Finalmente, el checkpoint también es responsable de la regulación por fosforilación de numerosas proteínas implicadas en diferentes procesos de reparación. Por ejemplo, la fosforilación de Sae2 por Mec1 y Tel1 promueve la resección de los DBSs [115], mientras que la fosforilación de Rad55 y Rad51 por Mec1 promueve la reparación por HR [116-118].

1.3.2 El checkpoint replicativo

El checkpoint replicativo es específico de fase S ya que responde únicamente a horquillas estresadas [119]. En estas horquillas se produce un desacoplamiento de la helicasa replicativa con la síntesis de ADN que genera una acumulación de ssDNA. Este desacoplamiento se puede producir tanto por inhibidores de la replicación tales como la hidroxiurea (HU), por mutaciones en componentes del replisoma, o por aductos en el ADN causados por agentes tales como el

metil metano sulfonato (MMS) o la luz ultravioleta (UV), los cuales suponen un obstáculo para el avance de las polimerasas replicativas. Al igual que en el checkpoint de daño, el ssDNA recubierto por Rpa1 activa el checkpoint al ser detectado por Mec1/Ddc2 y el complejo 9-1-1 [120].

Los checkpoints de daño en el ADN y replicativo comparten muchos componentes y funciones (Figura 1.3) [121, 122]. Aun así pueden distinguirse genéticamente por la proteína que conecta los sensores Mec1 y Tel1 con los efectores Rad53 y Chk1: Rad9 en el checkpoint de daño y Mrc1 en el checkpoint replicativo [123-125], aunque Rad9 puede complementar parcialmente la ausencia de Mrc1 [123]. Además de su papel en la señalización de daño replicativo, Mrc1 tiene un papel estructural en la horquilla de replicación uniéndose al replisoma a través del complejo protector de la horquilla Csm3-Tof1 [126] e interaccionando con Mcm6 y Pol ϵ [127, 128]. Estas interacciones son esenciales para acoplar la actividad de síntesis de ADN de Pol ϵ con la actividad helicasa del complejo MCM2-7 durante la fase S independientemente de que haya o no activación del checkpoint [127, 129]. En levaduras, Tof1 y Csm3 interaccionan físicamente con DDK [130, 131], con quien se ha propuesto que podrían cooperar durante la fase S en respuesta al ADN alquilado, detectando las horquillas bloqueadas, induciendo un enlentecimiento de la fase S y probablemente, coordinando la progresión de la cadena líder y retrasada [132].

De hecho, Cdc7 también modula la actividad del checkpoint replicativo [133-137]. Cdc7 fosforila a Mrc1, siendo esta fosforilación necesaria para la activación de Rad53 y Chk1 [138, 139]. Además, al menos en *S. pombe*, Cdc7 fosforila a Ddc1, lo que reduce la interacción entre Ddc1 y Rpa1 y favorece la liberación de la cromatina del complejo 9-1-1, y de esta manera el acceso de otras proteínas de reparación [136]. Curiosamente se ha propuesto también que Cdc7 atenúa la actividad del checkpoint a través de la regulación de Mec1, favoreciendo la reiniciación de la replicación [137].

Además de coordinar repuestas similares a las del checkpoint de daño en el ADN, tales como la parada mitótica o la regulación de mecanismos de reparación y tolerancia, el checkpoint replicativo regula otras repuestas específicas como son el mantenimiento de la integridad de la horquilla replicativa, la inhibición de los orígenes de replicación tardíos y el control de los procesos de recombinación homóloga (HR) durante la fase S.

1.3.2.1 Mantenimiento de la integridad de las horquillas replicativas

El checkpoint replicativo desencadena una serie de repuestas encaminadas a mantener la integridad de las horquillas para, una vez hayan cesado los problemas, poder reiniciar la

replicación [140]. En consecuencia, los mutantes *mec1Δ* y *rad53Δ* sufren un colapso irreversible de las horquillas de replicación incluso después de tratamientos cortos con MMS y HU [141, 142]. Estudios con el alelo *mec1-100* sugieren que el papel más importante de este checkpoint es la estabilización de las horquillas replicativas, ya que *mec1-100*, que no es hipersensible a MMS, es defectivo en la parada en el ciclo celular y en la inhibición de los orígenes tardíos pero funcional en el mantenimiento de la integridad de las horquillas replicativas [119].

Mec1 y Rad53 regulan diferentes nucleasas y helicasas para prevenir la formación de estructuras patogénicas en la horquilla que impidan la reanudación de la replicación tras la eliminación del daño [143]. Por ejemplo, Exo1 es modificada e inhibida por Rad53, impidiendo que actúe sobre horquillas estresadas, de tal manera que la ausencia de Exo1 suprime parcialmente la sensibilidad a MMS de *rad53Δ* [144, 145]. Dna2 y la nucleasa Mus81 también son fosforiladas por el checkpoint replicativo. En el caso de Dna2 esta fosforilación promueve su asociación con el ADN y previene la reversión de la horquilla gracias a su actividad helicasa, mientras que la fosforilación de Mus81 facilita su liberación de la cromatina previniendo su acción en la horquilla [146, 147].

La proteína de HR Rad51 también participa en la estabilidad de las horquillas estresadas [148]. En *Xenopus* se ha visto que previene la acumulación de ssDNA en las horquillas como consecuencia de la actividad de Mre11 [149]. De manera similar, BRCA2 análogo funcional de Rad52, tiene junto con Rad51 una función independiente de su actividad reparacional en la estabilización de las horquillas de replicación, protegiéndolas de la actividad de Mre11 [150].

La ausencia de numerosas proteínas del replisoma en horquillas bloqueadas por HU en los mutantes del checkpoint tales como *mec1Δ* y *rad53Δ* sugiere un papel del checkpoint en el mantenimiento de la estabilidad del replisoma [151, 152]. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la pérdida de los componentes del replisoma en mutantes de checkpoint está restringida a orígenes muy tempranos y refleja la incapacidad de estos mutantes de checkpoint de parar estas horquillas de replicación [153]. Aun no siendo necesario para la estabilización del replisoma, el checkpoint si es importante en la regulación por fosforilación de varios de sus componentes. Por ejemplo, la fosforilación de CMG por Rad53 inhibe su actividad helicasa [154], mientras que la fosforilación de Mcm2 por Mec1 promueve la recuperación del checkpoint a través del reclutamiento de Cdc5 [155]. Finalmente, en estudios en células de mamífero han demostrado que el checkpoint replicativo previene el colapso de las horquillas evitando un exceso de ssDNA (en parte mediante la inhibición de orígenes

tardíos) y la subsecuente depleción de RPA, el cual parece prevenir el colapso de las horquillas tanto protegiendo el ssDNA como regulando componentes del replisoma [156].

1.3.2.2 Inhibición de los orígenes de replicación tardíos

En células de mamíferos una horquilla de replicación bloqueada induce una doble respuesta: por un lado, la inhibición de la activación de los orígenes de replicación tardíos, y por otro, la activación de orígenes durmientes próximos a la horquilla bloqueada [49, 52, 157-159]. Con esta estrategia la célula asegura que las regiones que estaban siendo replicadas en presencia de estrés replicativo completen la síntesis de ADN, a la vez que se previene la replicación de zonas donde no se ha iniciado aún [158]. Como se ha comentado, la activación de algunos orígenes durmientes en *S. cerevisiae* requiere tanto la inhibición de la replicación pasiva como la inactivación del checkpoint [159], mientras que otros requieren la ausencia de actividad Sir2, lo que sugiere que están inhibidos por heterocromatinización [160].

En *S. cerevisiae* la inactivación de los orígenes de replicación tardíos es llevada a cabo a través de la fosforilación de Sld3 y Dbf4 [161, 162]. La fosforilación de Sld3 por Rad53 previene su interacción con Cdc45 y Dpb11 y por tanto la formación del preIC. Por otra parte, la fosforilación de Dbf4 atenúa la actividad de Cdc7, esencial para la iniciación de la replicación [163]. No obstante, hay datos tanto en levaduras como en células de mamífero a favor y en contra de la inhibición de Cdc7 en respuesta a estrés replicativo [164]. Como se ha comentado, Cdc7 es necesario para la activación del checkpoint y, como se verá posteriormente, de procesos de respuesta a daños tales como la ruta de síntesis trans-lesión (TLS, translesion synthesis). De manera similar, durante la respuesta a estrés se apagan los orígenes tardíos pero se activan los durmientes. Estudios recientes en *S. pombe* y células de mamífero han demostrado que DDK puede permanecer activa en la cromatina en respuesta a estrés replicativo a pesar de la caída en la actividad CDK, porque la ruta ATR-Chk1 inactiva APC^{Cdh1} y por tanto previene la degradación de Dbf4 [165]. Es posible por tanto que existan poblaciones localizadas de Cdc7 activo e inactivo. Concretamente, la fosforilación de Dbf4 por Rad53 en moléculas de DDK situadas en los orígenes tardíos inhibiría la activación de éstos.

1.3.2.3 Inhibición de la HR

Aparte de la regulación de proteínas de HR en las horquillas estresadas, el checkpoint replicativo previene la actividad reparacional por HR durante la fase S. Este punto se discutirá en detalle en el apartado “Regulación de la HR durante el ciclo” (4.2).

1.4. Mecanismos de reparación de daños en el ADN. La recombinación homóloga

Las células han desarrollado mecanismos de reparación específicos para cada tipo de lesión en el ADN. Las bases mal apareadas son reparadas por el mecanismo de reparación de apareamientos incorrectos (MMR, mismatch repair) [166]; las alteraciones químicas en las bases del ADN, tales como la metilación o la generación de sitios abásicos, se reparan mediante el mecanismo de reparación por excisión de bases (BER, base excision repair) [167, 168]; las lesiones que distorsionan la estructura de la doble hélice tales como los dímeros de pirimidina se corrigen mediante el mecanismo de reparación por excisión de nucleótidos (NER, nucleotide excision repair) [1, 169]; los cortes de cadena simple se reparan por el mecanismo de reparación de roturas de cadena simple (SSBR, single strand break repair); finalmente, los DSBs se reparan bien por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ, non homologous end joining) o bien por recombinación homóloga (HR, homologous recombination) [170, 171]. Por su importancia para la comprensión de esta tesis nos centraremos en el mecanismo de HR.

1.4.1 Reparación de DSBs por HR

La reparación por HR usa secuencias homólogas (cromátidas hermanas, cromosomas homólogos o secuencias repetidas en el mismo o en cromosomas diferentes) como molde para la reparación del DSB. Todas las rutas de reparación por HR requieren la resección de la cadena 5' mediante los mecanismos que se han explicado anteriormente y que terminan con la formación de un nucleofilamento de ssDNA/RPA de extremo 3' (Figura 1.4).

Rad51 (homóloga a RecA en bacterias) es una proteína central en la HR, ya que participa en los procesos de búsqueda de homología, invasión e intercambio de cadenas. Rad51 es cargada al ssDNA generado durante el proceso de resección gracias a la actividad mediadora de Rad52, proteína que compite con RPA para facilitar la unión de Rad51 a la molécula de ssDNA [172]. Rad52 sólo es necesaria en cantidades catalíticas para la formación del filamento presináptico, lo que sugiere que RPA es desplazado del ADN como consecuencia de la extensión de la polimerización de Rad51 [172, 173]. Además, Rad52 posee actividad de alineamiento de cadenas de ssDNA, la cual facilita la invasión de la molécula donadora de información con el nucleofilamento de ssDNA/Rad51 [172, 174]. Esta invasión desplaza una cadena y da lugar a la formación de una estructura en forma de D (D-loop) que es estabilizada mediante la actividad de intercambio de cadenas de Rad51 y la síntesis de ADN a partir del

extremo 3' de la cadena invasora. Todos estos pasos están regulados por numerosas actividades recombinogénicas y antirrecombinogénicas que generan intermediarios metaestables y reversibles que dan flexibilidad y robustez al proceso [175]. Por ejemplo, las actividad helicasa de Srs2 y Sgs1 promueve el desmantelamiento del nucleofilamento de Rad51/ssDNA [176, 177], mientras que los mediadores Rad55/Rad57 y el complejo Shu antagonizan la actividad de Srs2 [178]. De igual manera, la formación del D-loop esta favorecida por Rad51 y el factor Rad54 pero puede ser desmantelado por la helicasa Mph1 [179, 180].

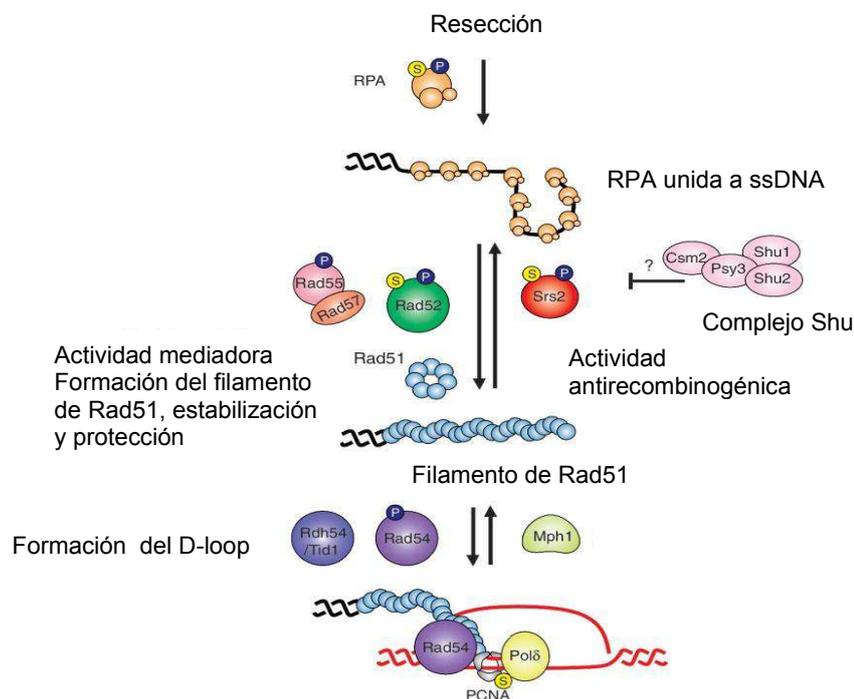


Figura 1.4. Formación del filamento de Rad51. RPA es desplazada del ssDNA por Rad51 con ayuda de los mediadores Rad52 y Rad55-Rad57. Srs2 promueve el desmantelamiento del filamento de Rad51, mientras que Rad52 y Rad55-57 antagonizan esta actividad. El complejo Shu promueve la función de Rad51 y también puede antagonizar la función de Srs2. El nucleofilamento de Rad51 promueve la búsqueda de homología con la ayuda de Rad54 y Rhd54, mientras que Mph1 lo desestabiliza. Adaptado de [180].

1.4.2 Regulación de la HR durante el ciclo

A pesar de la importancia de la HR en la reparación de DSBs, este mecanismo implica un riesgo para la integridad genómica por tres razones principales. La primera de ellas es que la síntesis de ADN asociada al proceso de reparación es mutagénica en comparación con la replicación normal [181-183]. La segunda razón es que un procesamiento incorrecto de los intermediarios

replicativos por HR es altamente genotóxico al favorecer reordenamientos genómicos como hemos ya adelantado [176, 184, 185]. Por último, la HR es una fuente potencial de inestabilidad genética cuando no utiliza como molde la cromátida hermana, ya que puede dar lugar a pérdida de heterocigosidad, deleciones, inversiones y translocaciones recíprocas [186].

Por todo ello, la elección entre las diferentes rutas de reparación de DSBs está altamente regulada. La HR requiere actividad CDK, lo que implica que está inhibida en G1 y activa en S y G2, cuando la célula dispone de cromátidas hermanas como molde [187]. Un paso esencial en esta regulación es el control de la resección, mediado por la fosforilación de Sae2 y Dna2 por CDK.

El checkpoint replicativo juega también un papel importante en la regulación de la HR durante el ciclo. En presencia de drogas tales como el MMS o la HU, Mrc1 inhibe la resección de los DSBs y por tanto su reparación por HR [188]. Es importante destacar que el reclutamiento de los factores de HR a los DSBs es independiente de replicación [188], y debido a ello la expresión de Rad52 en G2/M es suficiente para la reparación de los DSBs producidos durante la fase S [189].

1.5. Tolerancia al daño en el ADN

A pesar de que las células disponen de numerosos mecanismos de reparación, las horquillas replicativas se pueden encontrar con lesiones que impiden su avance. En estos casos, la célula tiene que decidir entre reparar la lesión o avanzar sobre ésta y posponer su reparación, para lo que dispone de mecanismos de “tolerancia” a daño en el ADN (DDT, DNA damage tolerance). La reparación del daño asegura fidelidad, aunque puede extender excesivamente la duración de la replicación e inducir inestabilidad genética. Por el contrario, la DDT facilita la progresión de la replicación, aunque puede ser mutagénica y está asociada a procesos que pueden conducir a reordenamientos genómicos. Los primeros modelos de DDT proponían que la horquilla era capaz de reiniciar la replicación tras la colisión con los obstáculos replicativos, dejando huecos de ssDNA tras de sí que serían procesados postreplicativamente; sin embargo, el relleno de los huecos también podría estar acoplado al avance de la horquilla a través de la lesión (Figura 1.5) [190]. En ambos casos, estos mecanismos facilitan el avance de la horquilla y promueven el relleno de fragmentos de ssDNA posponiéndose la reparación de la lesión inicial. Debido a la importancia de estos mecanismos en el mantenimiento de la estabilidad genómica y a que pueden estar asociados a mutaciones, la DDT debe estar altamente regulada con el fin de prevenir efectos deletéreos para la célula.

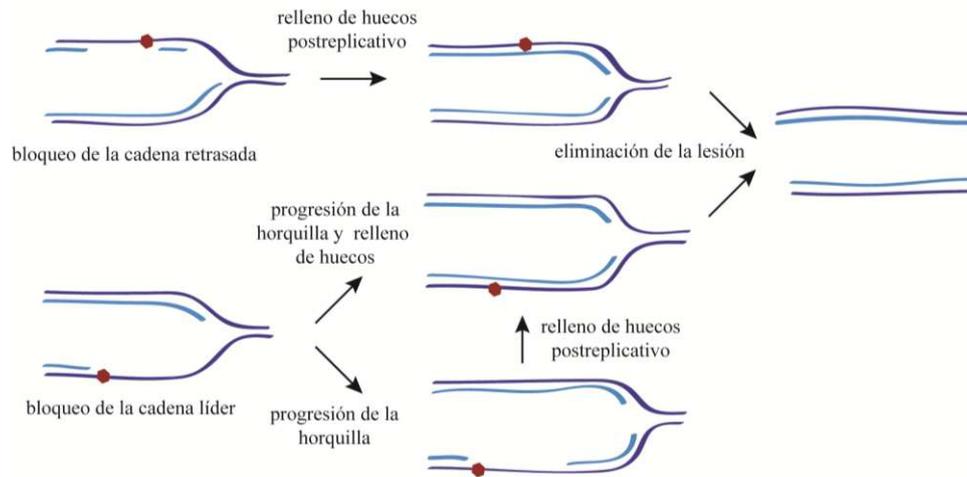


Figura 1.5. Progresión de la horquilla y relleno de huecos tras una lesión en la cadena líder o la retrasada. Un bloqueo de la cadena líder da lugar a una acumulación transitoria de ssDNA debido al desacoplamiento de la síntesis de ADN entre la cadena líder y la retrasada, mientras que el bloqueo de la cadena retrasada es superado mediante la síntesis de un nuevo fragmento de Okazaki. Las horquillas replicativas son capaces de superar ambos tipos de lesión y rellenar los huecos de ssDNA durante la replicación o postreplicativamente. Adaptado de [190].

Los principios básicos de la DDT están conservados desde levaduras hasta humanos. Existen dos tipos de mecanismos diferentes. En los mecanismos de TLS las polimerasas de la horquilla Pol δ y Pol ϵ son sustituidas por polimerasas replicativas de menor procesividad pero capaces de introducir un nucleótido al azar en el sitio opuesto a la base dañada [191]. En levaduras TLS puede operar mediante dos rutas distintas: una ruta mutagénica en la que participan Rev1 y Pol ζ (codificada por *REV3* y *REV7*) y otra no mutagénica en la que participa Pol η (codificada por *RAD30*) [192]. En los mecanismos de cambio de molde (TS, template switching) se utiliza la cromátida hermana intacta para pasar el daño mediante un intercambio de cadenas. Por tanto, es un proceso libre de errores [193].

El complejo ubiquitina-ligasa Rad6-Rad18 juega un papel clave en el control de las rutas de DDT. Consistente con eso, los mutantes *rad6* y *rad18* son extremadamente sensibles a radiación UV y MMS y completamente defectivos en el relleno de huecos de ssDNA [194, 195]. La importancia de Rad6-Rad18 en DDT está asociada a PCNA, que actúa como un interruptor molecular que regula los diferentes mecanismos de DDT. En presencia de daños en el ADN, como los fotoproductos generados por la radiación UV o la alquilación de bases por MMS, Rad6-Rad18 se une al ssDNA y ubiquitina a PCNA en la lisina 164 (K164) (Figura 1.6) [196]. La monoubiquitinación de PCNA promueve TLS al facilitar el reclutamiento de las polimerasas de TLS a los sitios de daño [196]. En levaduras, Cdc7 interacciona con y fosforila a Rev7, una de las subunidades de Pol ζ [197]. En humanos Cdc7 participa en este proceso fosforilando a

Rad18, lo que facilita la interacción de Pol η con éste y posteriormente con PCNA en los sitios de daño [198, 199].

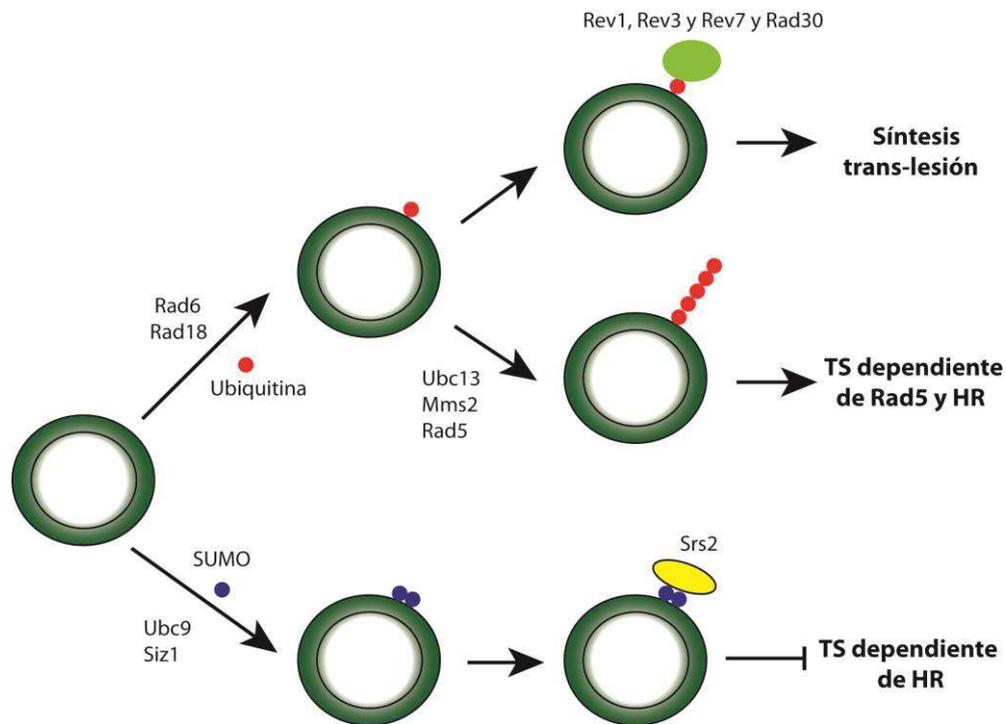


Figura 1.6. Regulación de las rutas de DDT por PCNA. PCNA puede ser ubiquitinada en K164 por Rad6-Rad18. La monoubiquitinación facilita el reclutamiento de las polimerasas de TLS. La poliubiquitinación de PCNA por Ubc13/Mms2/Rad5 promueve TS mediante un mecanismo que requiere intercambio de cadenas mediado por Rad52, Rad51 y Rad5. PCNA es también sumoilado en K164 por Ubc9/Siz1; esta sumoilación recluta a la helicasa Srs2 que inhibe durante fase S un mecanismo de TS dependiente de HR e independiente de ubiquitinación de PCNA.

Un aspecto mecánico que aún no ha sido resuelto es si la reparación por TLS está acoplada al avance de la horquilla de replicación a través del daño o es postreplicativa. En el primer caso, la síntesis a través del daño se realizaría mediante un intercambio de polimerasas en la horquilla. Alternativamente, las horquillas podrían reiniciar la replicación tras la colisión con los obstáculos replicativos dejando tras de sí huecos de ssDNA que serían procesados postreplicativamente. Esta posibilidad es consistente con la observación mediante microscopía electrónica de huecos de ssDNA detrás de las horquillas en mutantes de TLS irradiados con luz UV [200, 201]. De igual manera, se ha observado que las células de mamífero acumulan ssDNA tras la replicación en presencia de irradiación UV, sobre todo en mutantes de Pol η . Además, el enlentecimiento del avance de las horquillas tras irradiar con UV no se ve afectado en mutantes de TLS [202, 203], y se ha demostrado que TLS es capaz de reparar el daño

replicativo cuando la expresión de alguno de sus componentes se restringe a G2 [204, 205]. Todos estos datos sugieren que los mecanismos de TLS operan exclusivamente en los huecos de ssDNA dejados detrás de la horquilla. TLS no es la principal ruta de reparación en levaduras, como sugiere la escasa sensibilidad a daño en el ADN del triple mutante *rev1Δ rev3Δ rad30Δ* [194, 195, 206].

La extensión de la ubiquitinación de PCNA por el complejo Mms2/Rad5 en la lisina 164 mediante una cadena de poliubiquitina unida por la lisina 63 promueve TS (Figura 1.6) [207]. Ensayos moleculares y de viabilidad en presencia de daño han demostrado que este mecanismo constituye la principal ruta de DDT tanto en condiciones de alto como bajo estrés replicativo [194, 195, 206, 208, 209]. El mecanismo mediante el cual la poliubiquitinación de PCNA activa la ruta de TS no se conoce aún, aunque estudios moleculares en levaduras han demostrado que el intercambio de cadenas requiere la maquinaria de HR [193]. Se han propuesto diferentes mecanismos de TS en la que la nueva cromátida hermana es utilizada como molde para la replicación, y se describen brevemente en la Figura 1.7 [190]. Independientemente de su origen, estas uniones entre cromátidas hermanas (SCJs, sister chromatid junctions) se pueden detectar mediante geles bidimensionales en mutantes en el complejo Sgs1/Top3/Rmi1 implicado en su disolución [210-212].

Numerosos datos sugieren que la ruta de TS mediada por Rad6/Rad5/Rad51 opera durante fase S: 1) la pérdida de viabilidad de los mutantes *rad18* puede ser rescatada reactivando la expresión de Rad18 en G2/M en ausencia de Rad5, pero no de Rev3, lo que sugiere que Rad5 requiere Rad18 durante fase S para tolerar el daño [194, 205]; 2) el mutante *mms2Δ* y no *rev3Δ* retrasa la entrada en G2 [194]; 3) la monoubiquitinación y poliubiquitinación de PCNA se detecta inicialmente en fase S; y 4) el checkpoint replicativo se activa en mutantes que carecen de Rad5 o lo expresan en G2 [204]. Consistente con esta hipótesis, Rad5 es necesaria para la progresión de la horquilla replicativa y la completa terminación de la replicación a través de ADN alquilado [213].

De igual manera, diferentes aproximaciones moleculares y celulares han demostrado que la replicación a través de ADN alquilado requiere Rad52 y Rad51 en la horquilla [188, 189, 212, 214]. De hecho, el enlentecimiento de la replicación como consecuencia de la actividad de Rad51 y su parólogo XRCC3, sugieren un papel activo de la HR en la modulación de la progresión de la horquilla a través de ADN alquilado [215]. Consistente con esta función replicativa, diferentes aproximaciones en levaduras, *Xenopus* y humanos, han demostrado que Rad51 y Rad52 se unen a las horquillas de replicación durante la fase S tanto en presencia como ausencia de daño [149, 189, 216].

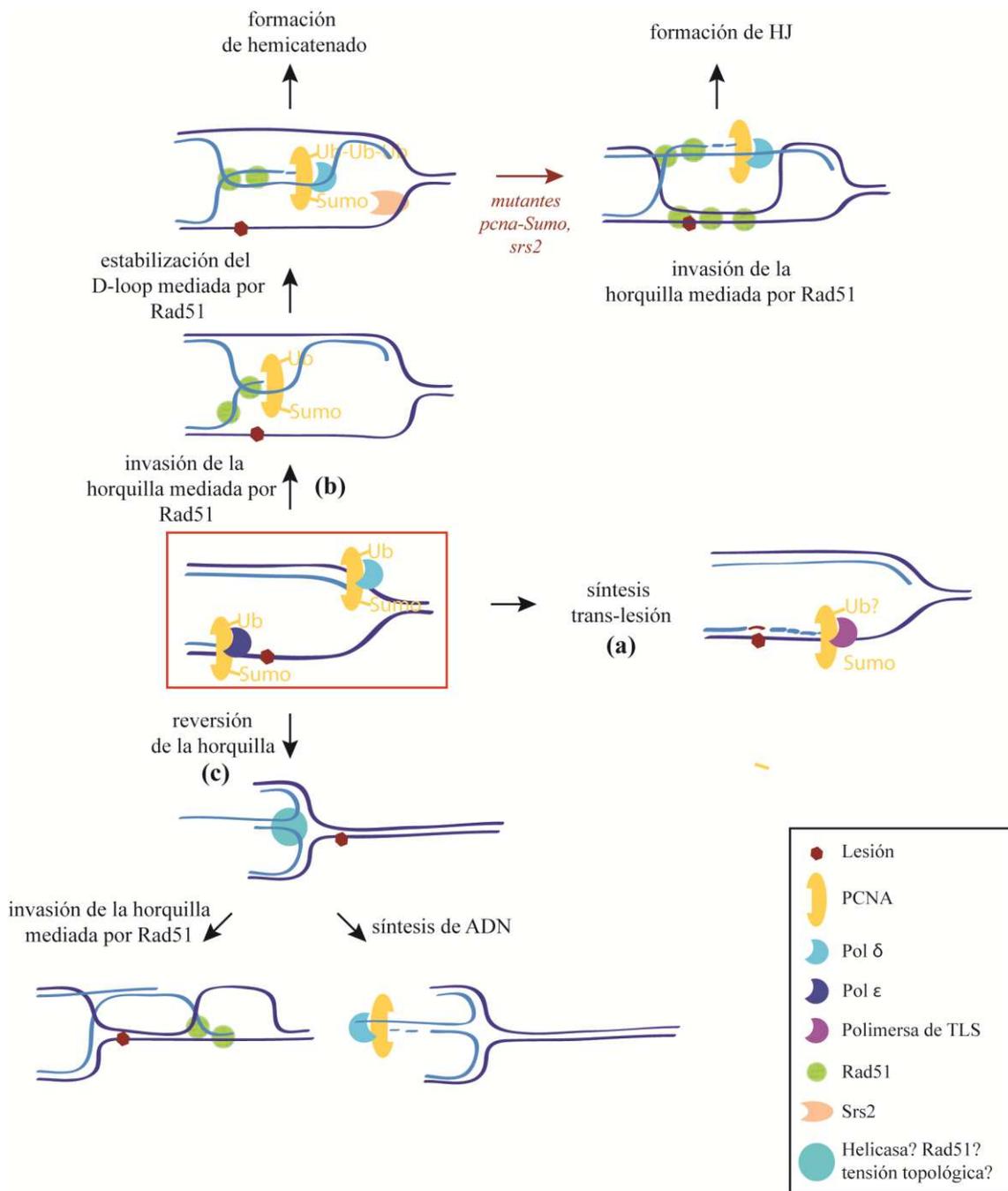


Figura 1.7. Mecanismos de TS durante la fase S. La horquillas replicativas pueden superar la lesión mediante el cambio de la polimerasa replicativa por la de TLS (a) o por la formación de SCJs (b,c). La invasión de la cromátida hermana podría generar una estructura tipo HJ, que debe ser posteriormente disuelta/resuelta (b). Alternativamente, el mecanismo de “regresión de la horquilla” facilitaría el alineamiento de las cadenas sintetizadas *de novo* generando una estructura cruciforme conocida como “chicken foot” y que podría ser posteriormente procesado por diferentes mecanismos (c).

Sin embargo, existen también datos que sugieren que esta ruta tiene funciones postreplicativas; así, se han detectado mediante microscopía electrónica fragmentos de ssDNA detrás de las horquillas de mutantes *rad51Δ* y *rad52Δ* irradiados con luz UV y MMS [149, 200, 201]. Por otro lado, los mecanismos de TS parecen ser capaces de reparar el daño replicativo cuando la expresión de algunos de sus componentes esenciales se restringe a G2, indicando que pueden funcionar desacoplados de la horquilla de replicación [204, 205]. Finalmente, el análisis de la dinámica de focos de Rad52 y Rad51 en respuesta a MMS sugiere que al menos una parte de la reparación recombinacional de los huecos de ssDNA es retrasada hasta G2/M mediante un proceso que depende del checkpoint replicativo, lo que separaría las funciones replicativas y reparacionales de la HR durante la DDT [189].

La cooperación de Rad6/Rad18/Rad5 con Rad51/Rad52 en la formación de SCJs en repuesta a daños contrasta con el efecto aditivo de los mutantes dobles respecto a los simples observado en ensayos de sensibilidad a daños en el ADN y relleno de huecos de ssDNA, el cual sugiere que Rad5 y Rad52 definen dos rutas independientes de TS [217]. La explicación a estos resultados es la existencia de una segunda ruta de HR independiente de ubiquitinación de PCNA que está regulada por una segunda modificación de PCNA tanto en condiciones de estrés replicativo como sin ellas: la sumoilación de las lisinas 164 y 127 por el complejo Ubc9/Siz1 [196]. Esta modificación recluta la helicasa Srs2, la cual inhibe esta ruta durante la fase S (Figura 1.6) [218, 219]. En consecuencia, tanto los mutantes *srs2Δ* como los mutantes defectivos en la sumoilación de PCNA suprimen la sensibilidad a daño de *rad6Δ*, *rad18Δ* y *rad5Δ*, y esta supresión depende de las proteínas de recombinación homóloga Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 y Rad57 [177, 218, 219]. Esta ruta de HR alternativa está también asociada con la formación de SCJs [220] pero restringida a condiciones de alto estrés replicativo [194, 195, 217]. La regulación negativa de la ruta de HR mediante la sumoilación de PCNA sugiere que este mecanismo opera postreplicativamente. Actualmente se desconoce los mecanismos mediante los cuales Srs2 inhibe esta ruta de HR pero no las funciones recombinogénicas asociadas a la ruta dependiente de Rad5.

Las funciones replicativas y reparacionales de las proteínas de HR se han plasmado en diferentes modelos, y numerosos datos sugieren que están separadas tanto en el espacio como en el tiempo (S y G2/M), posiblemente para evitar la inestabilidad genética que se podría producir al interferir la reparación con la replicación [186]. A pesar de esta separación, las funciones replicativas y reparacionales de la HR están acopladas mecánicamente, como sugiere el hecho de que la restricción de la expresión de Rad52 a G2/M impida la unión de Rad51 a los fragmentos de ssDNA, la formación de SCJs y focos de reparación, y la reparación

de los huecos de ssDNA [189]. Nuestra hipótesis es que la carga de Rad52 y Rad51 a los daños replicativos está acoplada al avance de la horquilla de replicación, lo que marcaría una diferencia substancial con la reparación de DSBs por HR, donde el reclutamiento es independiente de replicación [188, 189, 221].

1.6 Objetivos

El objetivo principal de este proyecto ha sido estudiar los mecanismos de unión de las proteínas de recombinación homóloga a los daños replicativos durante la DDT. En particular, nos hemos centrados en dos aspectos:

1. El papel de la quinasa Cdc7 en la unión de la maquinaria de HR a los daños replicativos mediante su interacción con la helicasa MCM2-7.
2. El papel del reciclaje de histonas por ensambladores de cromatina en la respuesta a daños replicativos.

2. RESULTADOS: PARTE 1

2.1 Rad51 y Rad52 interactúan con MCM2-7 independientemente de daños en el ADN en *S. cerevisiae*

Las proteínas de recombinación homóloga Rad51 y Rad52 participan en la DDT mediante funciones replicativas y reparacionales [186]. Rad51 y Rad52 viajan con las horquillas de replicación y facilitan su avance en presencia de daños en el ADN, quedando unidas a los fragmentos de ssDNA cuya reparación promueven una vez terminada la replicación [189]. Con el objetivo de entender el mecanismo por el cual Rad51 y Rad52 interactúan con la horquilla replicativa y se unen a los daños que quedan detrás, decidimos analizar el papel de la helicasa replicativa MCM2-7. En *S. pombe*, Mcm4 interactúa con Rph51 (homólogo de Rad51) en respuesta a HU [222]. Por otra parte, se han detectado interacciones entre Mcm2 y Mcm3 con Rad52 y Rad51 tanto en ausencia como en presencia de daños en células humanas [222, 223]. Decidimos analizar si estas interacciones también ocurrían en *S. cerevisiae*. Para ello inmunoprecipitamos la quimera Mcm4-GFP en cultivos asincrónicos y analizamos la interacción con Rad51 y Rad52 mediante western blot. Como se muestra en las Figuras 2.1A y 2.1B, Rad51 y Rad52 coinmunoprecipitaron con Mcm4-GFP, indicando que en *S. cerevisiae* la interacción entre MCM2-7 y Rad51 y Rad52 está conservada. Debido a que el reclutamiento de Rad51 a los daños generados por MMS depende de Rad52 [189], decidimos determinar si Rad52 es necesario para la interacción entre Rad51 y Mcm4. Los experimentos de coinmunoprecipitación mostraron que Rad51 interactúa con Mcm4-GFP independientemente de Rad52 (Figura 2.1A). De hecho, la interacción entre Rad51 y Mcm4-GFP es mayor en el mutante *rad52Δ*, lo que sugiere que hay más Rad51 disponible para interactuar con MCM2-7.

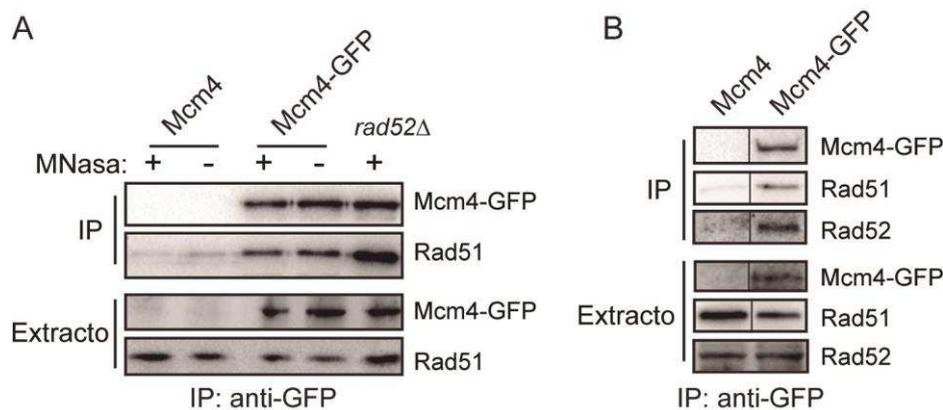


Figura 2.1. Mcm4 interactúa con Rad51 y Rad52. (A, B) Coinmunoprecipitación de Mcm4-GFP con Rad51 y Rad52 en extractos de cultivos asincrónicos de células silvestres y *rad52Δ* que expresan Mcm4-GFP. Como control negativo se usó una estirpe silvestre Mcm4. Los extractos se trataron o no con MNasa (A) o benzonasa (B). Los experimentos se repitieron 2 veces con resultados similares.

Las interacciones se observaron en lisados tratados o no con nucleasa micrococcal (MNasa) que genera fragmentos cromatínicos de ~250 pb (Figura 2.1A) o con benzonasa que genera fragmentos de ADN <8 pares de bases (Figura 2.1B), lo que demuestra que las interacciones entre MCM2-7 con Rad51 y Rad52 no están mediadas por ADN.

Para determinar si la interacción entre MCM2-7 y Rad51 depende o no de la presencia de daño en ADN, cultivos asincrónicos fueron tratados o no durante 2 horas con MMS al 0,015%, un agente genotóxico que dificulta el avance de la horquilla replicativa mediante la alquilación del ADN y que es altamente tóxico en células defectivas en HR [141, 224]. Como se observa en la Figura 2.2, Mcm4-GFP y Rad51 interaccionaron independientemente de la presencia o ausencia de daño. En conjunto, estos datos demuestran que la interacción entre la helicasa MCM2-7 y las proteínas de recombinación homóloga Rad51 y Rad52 esta conservada de levaduras a humanos.

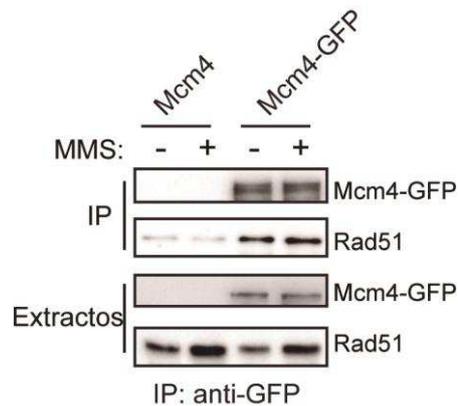


Figura 2.2. La interacción de Mcm4 y Rad51 es independiente de daño. Coimmunoprecipitación de Mcm4-GFP y Rad51 en extractos tratados con MNasa de cultivos asincrónicos de células silvestres incubados o no durante 2 horas con MMS al 0,015%. Como control negativo se usó una estirpe silvestre Mcm4. El experimento se repitió 2 veces con resultados similares.

2.2. La actividad quinasa de Cdc7 promueve la interacción entre Mcm4 y Rad51

La quinasa Cdc7 es el principal regulador de la actividad de MCM2-7 [225]. Por ello, decidimos analizar si la interacción entre Rad51 y Mcm4 estaba regulada por Cdc7. Para eliminar la actividad quinasa de Cdc7 de forma selectiva usamos un alelo de *CDC7* (*cdc7-as3*) que es sensible al inhibidor 1NMPP1, un análogo no hidrolizable del ATP [226]. Ya que la actividad quinasa de Cdc7 es esencial para la iniciación de la replicación [18, 19], el experimento se llevó a cabo sincronizando las células en G1 y liberándolas en fase S en presencia de MMS al 0,015%. A los 35 minutos, tiempo suficiente para que se inicie la replicación, el cultivo se dividió en dos y se añadió 1NMPP1 o su vehículo (DMSO). A los 90 minutos tras la liberación de G1 se llevó a

cabo la coimmunoprecipitación. Como se observa en la Figura 2.3A, el inhibidor eliminó la interacción entre Rad51 y Mcm4, lo que indica que ésta requiere la actividad quinasa de Cdc7 de forma continua.

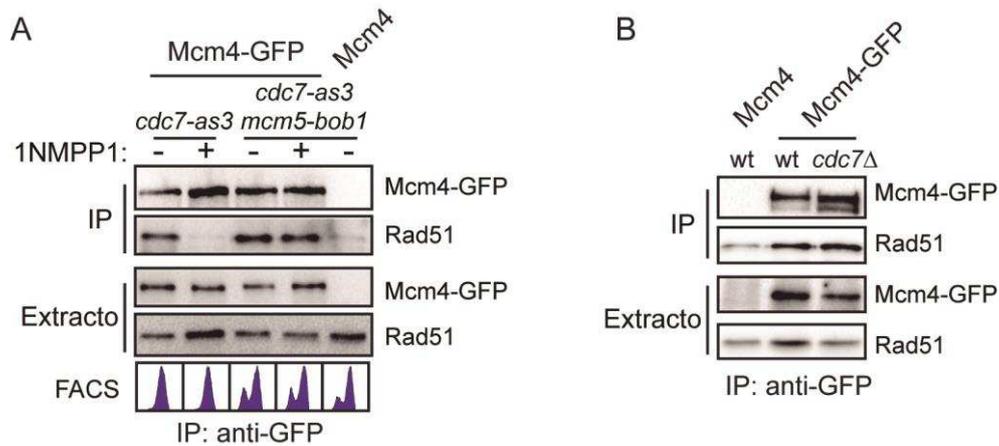


Figura 2.3 La interacción de Mcm4 y Rad51 depende de la actividad quinasa de Cdc7. (A) Coimmunoprecipitación de Mcm4-GFP y Rad51 en extractos tratados con MNasa de cultivos de células *cdc7-as3* y *cdc7-as3 mcm5-bob1* que expresan Mcm4-GFP. Los cultivos se sincronizaron en G1 y se liberaron en medio fresco en presencia de MMS al 0,015% durante 90 minutos. A los 35 minutos tras la liberación el cultivo se dividió en dos y las células fueron tratadas con 1NMPP1 15 μ M o DMSO. (B) Coimmunoprecipitación de Mcm4-GFP y Rad51 en extractos tratados con MNasa de cultivos asincrónicos *mcm5-bob1* o *mcm5-bob1 cdc7Δ*. El experimento se repitió 4 (A) ó 2 (B) veces con resultados similares. Como control negativo se usó una estirpe silvestre Mcm4.

A continuación decidimos analizar la interacción en ausencia de Cdc7. Aunque la ausencia de Cdc7 es letal debido al papel de Cdc7 en iniciación de la replicación [227, 228], el mutante *cdc7Δ* puede crecer en presencia de la mutación *mcm5-bob1* [30]. Se ha propuesto que esta mutación induce en el complejo MCM2-7 una conformación estructural similar a la generada por la fosforilación de MCM2-7 por Cdc7, lo cual permite iniciar la replicación sin necesidad de la actividad quinasa de Cdc7 [31]. La interacción entre MCM2-7 y Rad51 también se observó en el mutante *mcm5-bob1 cdc7Δ* (Figura 2.3B), lo que sugiere que *mcm5-bob1* también suprime el requerimiento de actividad quinasa de Cdc7 necesario para que se produzca la interacción entre la helicasa y Rad51. De acuerdo con esta hipótesis, la interacción entre Mcm4 y Rad51 se mantuvo en el mutante *cdc7-as3 mcm5-bob1* tanto en presencia como en ausencia de 1NMPP1 (Figura 2.3A). Estos datos sugieren que los cambios conformacionales en MCM2-7 inducidos por Cdc7 favorecen la interacción de la helicasa con Rad51.

2.3 MCM2-7, Rad51 y Rad52 presentan cinéticas similares de unión a la cromatina durante el ciclo celular

Con el fin de comprender el significado biológico de la interacción de Mcm4 con Rad51 y Rad52 decidimos estudiar la cinética de unión al ADN de ambas proteínas en cultivos sincronizados en G1 y liberados en fase S hasta G2/M mediante fraccionamiento de cromatina y western blot. El fraccionamiento de cromatina nos permite aislar las proteínas que se encuentran unidas a la cromatina de las proteínas nucleares y citosólicas solubles. El análisis de cantidades de proteínas celularmente equivalentes de las dos fracciones mostró que la fracción cromatínica estaba enriquecida en histona H4, mientras que la cantidad de la proteína citosólica fosfoglicerato quinasa 1 (Pgk1) era prácticamente indetectable. Por el contrario, la fracción soluble estaba enriquecida en Pgk1 y apenas se detectó la histona H4 (Figura 2.4B y 2.4D).

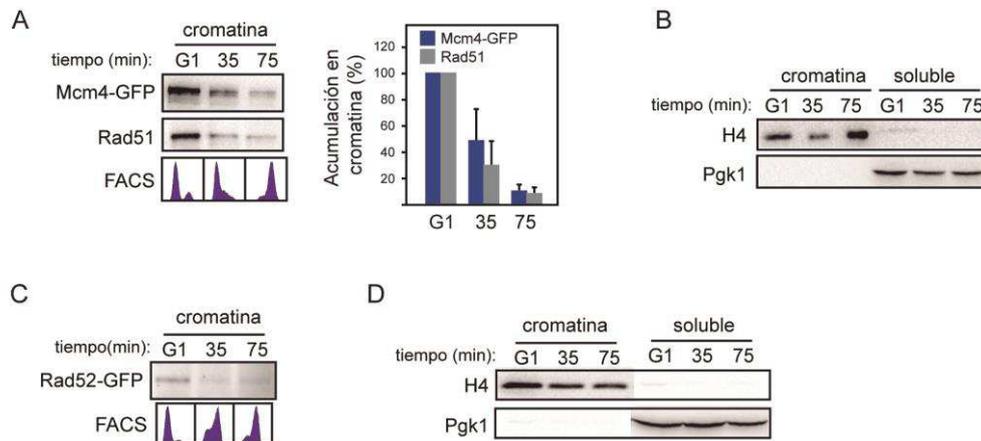


Figura 2.4. MCM2-7, Rad51 y Rad52 tienen cinéticas de unión a la cromatina similares. Unión de Mcm4-GFP, Rad51 (A,B) y Rad52-GFP (C,D) a la cromatina mediante ensayos de fraccionamiento de cromatina y western blot en cultivos de células silvestres expresando Mcm4-GFP (A,B) o Rad52-GFP (C,D). Los cultivos fueron sincronizados en G1 y liberados hasta G2/M. (B,D) Control del fraccionamiento de cromatina mediante western blot de Pgk1 y H4 de las fracciones cromatínica y soluble. (A) Se muestra la media y la SEM de 3 experimentos independientes en los que la histona H4 se utilizó como control de carga de la fracción cromatínica. (C) El experimento se repitió 2 veces con resultados similares. La progresión del ciclo se siguió mediante citometría de flujo.

Todas las subunidades del complejo helicasa MCM2-7 presentan la misma cinética de unión a la cromatina: se incorporan durante el final de mitosis y G1 y se van liberando conforme las células completan la replicación [3, 229, 230]. Consistente con esto, el análisis de la unión de Mcm4 a la cromatina mostró un pico de acumulación en G1 que fue desapareciendo conforme las células progresaron a lo largo del ciclo (Figura 2.4A). De manera

inesperada, dado que la HR es inactiva en G1, Rad51 y Rad52 presentaron un patrón de unión a la cromatina similar al de Mcm4 acumulándose en G1 y liberándose a lo largo de la fase S (Figura 2.4A y 2.4C). En conjunto, estos datos sugieren que Rad51 y Rad52, al igual que MCM2-7, se acumulan en la cromatina en G1 para ser posteriormente liberados conforme se completa la replicación.

2.4 La acumulación de Rad51 en la cromatina en G1 es independiente de MCM2-7

El mecanismo de entrada de Rad51 a la cromatina aún se desconoce. Aunque la ausencia de actividad quinasa de Cdc7 en G1 [231] sugiere que Rad51 y MCM2-7 no interactúan durante esta fase, la similitud de las cinéticas de unión de Rad51 y Mcm4 a la cromatina nos decidió a evaluar si la carga de Rad51 en G1 dependía de MCM2-7. Dado que Cdc6 es esencial para la carga de MCM2-7 [4], utilizamos células en las que su expresión está bajo control del promotor *GAL1* regulado por fuente de carbono (*Gp-GAL6*). Las células *CDC6* y *Gp-CDC6* se crecieron en galactosa y se sincronizaron en metafase con nocodazol; posteriormente se incubaron 1h con glucosa para inhibir la expresión de Cdc6 [119] y en consecuencia la carga de MCM2-7, y finalmente se liberaron en presencia de factor α para sincronizarlas en la fase G1 del siguiente ciclo (Figura 2.5). La cantidad de Rad51 en la cromatina en G1 no se vio afectada a pesar de la disminución en la cantidad de MCM2-7 cargado en la cromatina (Figura 2.5A). Este resultado indica que MCM2-7 y Rad51 se cargan en la cromatina de manera independiente. Curiosamente los niveles totales de MCM2-7 en la célula también disminuyeron, lo que sugiere que el complejo es degradado si no se incorpora a la cromatina (Figura 2.5B).

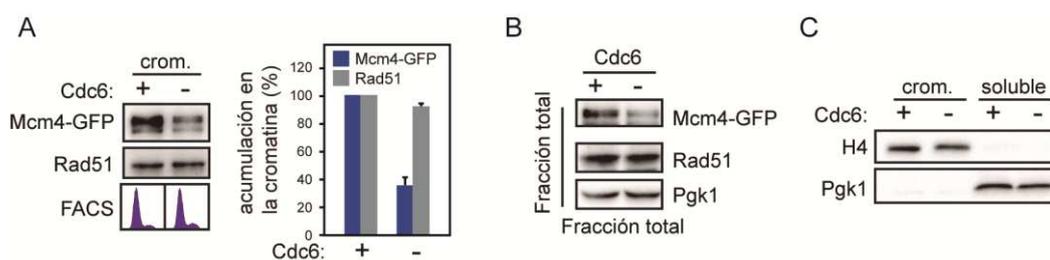


Figura 2.5. La acumulación en la cromatina de Rad51 en G1 es independiente de MCM2-7. Unión a la cromatina (A) y fracción total (B) de Mcm4-GFP y Rad51 en G1 mediante ensayos de fraccionamiento de cromatina y western blot de cultivos de células *CDC6* y *Gp-CDC6* sincronizadas en G1 en condiciones de depleción de Cdc6. Para ello, los cultivos fueron sincronizados en G1 y liberadas en medio fresco con 1% DMSO y nocodazol 15 μ g/ml; a los 90 min tras las liberación se añadió glucosa al 2% y se reañadió nocodazol 15 μ g/ml durante 1 h. A continuación las células se liberaron en medio fresco con 2% glucosa y factor α durante 2,5 h. (C) Control del fraccionamiento de cromatina mediante western blot de Pgk1 y H4 de las fracciones cromatínica y soluble. Se muestra la media y SEM de 3 experimentos independientes, así como el control de fraccionamiento, fracción total y cinética de unión a la cromatina de un experimento representativo. La histona H4 y Pgk1 se utilizaron como control de carga de la fracción cromatínica y de la fracción total, respectivamente.

Con objeto de confirmar que la entrada en G1 tanto de MCM2-7 como de Rad51 es independiente de su interacción, estudiamos el efecto de la inhibición de la actividad quinasa de Cdc7 sobre la acumulación de MCM2-7 y Rad51 en la cromatina en G1. Para ello, las células se sincronizaron en G1 y se liberaron en fase S; a los 45 minutos (con la replicación casi completada) el cultivo se dividió en dos y se trató con 1NMPP1 o DMSO y factor α para sincronizarlo en la fase G1 del siguiente ciclo. La inhibición de la actividad quinasa de Cdc7 en fase S tardía dio lugar a una caída significativa en la cantidad de Mcm4 y de Rad51 presentes en la fracción cromatínica (Figura 2.6A y 2.6C). Sin embargo, el análisis de la proteína total demostró que esa caída no era específica de la fracción cromatínica (Figura 2.6B y 2.6C), lo que sugiere que Cdc7 es necesario para mantener la estabilidad de MCM2-7 y Rad51 una vez finalizada la replicación.

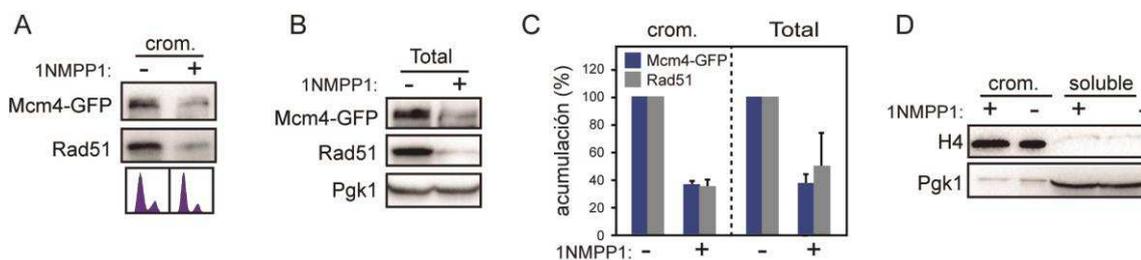


Figura 2.6. La acumulación de Mcm4-GFP y Rad51 en G1 depende de la actividad quinasa de Cdc7. Unión a la cromatina (A) y fracción total (B) de Mcm4-GFP y Rad51 en G1 mediante ensayos de fraccionamiento de cromatina y western blot de cultivos de células *cdc7-as3* sincronizadas en G1 en condiciones de inhibición de la actividad quinasa de Cdc7. Para ello los cultivos fueron sincronizados en G1 y liberadas en medio fresco; a las 45 min tras la liberación se añadió factor α y 15 μ M NMPP1 o DMSO durante 1h 45 min. (C) Acumulación de Mcm4-GFP y Rad51 en la cromatina (izquierda) y en la fracción total (derecha). Se muestra la media y SEM de 3 experimentos independientes, así como el control de fraccionamiento, fracción total y cinética de unión a la cromatina de un experimento representativo. La histona H4 y Pgk1 se utilizaron como control de carga de la fracción cromatínica y de la fracción total, respectivamente.

2.5 MCM2-7, Rad51 y Rad52 se mantienen en la cromatina en respuesta a daños replicativos por MMS

La interacción entre MCM2-7 con Rad51 y Rad52, esenciales para la DDT, nos llevó a analizar la unión de Mcm4, Rad51 y Rad52 a la cromatina durante el ciclo celular en presencia de daño replicativo. Repetimos los experimentos de fraccionamiento de cromatina en células sincronizadas en G1 y liberadas en presencia de MMS al 0,025% hasta fase G2/M. Bajo estas condiciones ni Mcm4, ni Rad51, ni Rad52 fueron liberadas de la cromatina durante las fases S y G2; de hecho, la cantidad de proteína unida a la cromatina dañada aumentó a lo largo de las

cinéticas (Figura 2.7A y 2.7B). La similitud en las cinéticas de unión a la cromatina en presencia de daño sugiere un papel de la helicasa MCM2-7 en respuesta a estrés replicativo que estaría coordinado con las proteínas Rad51 y Rad52.

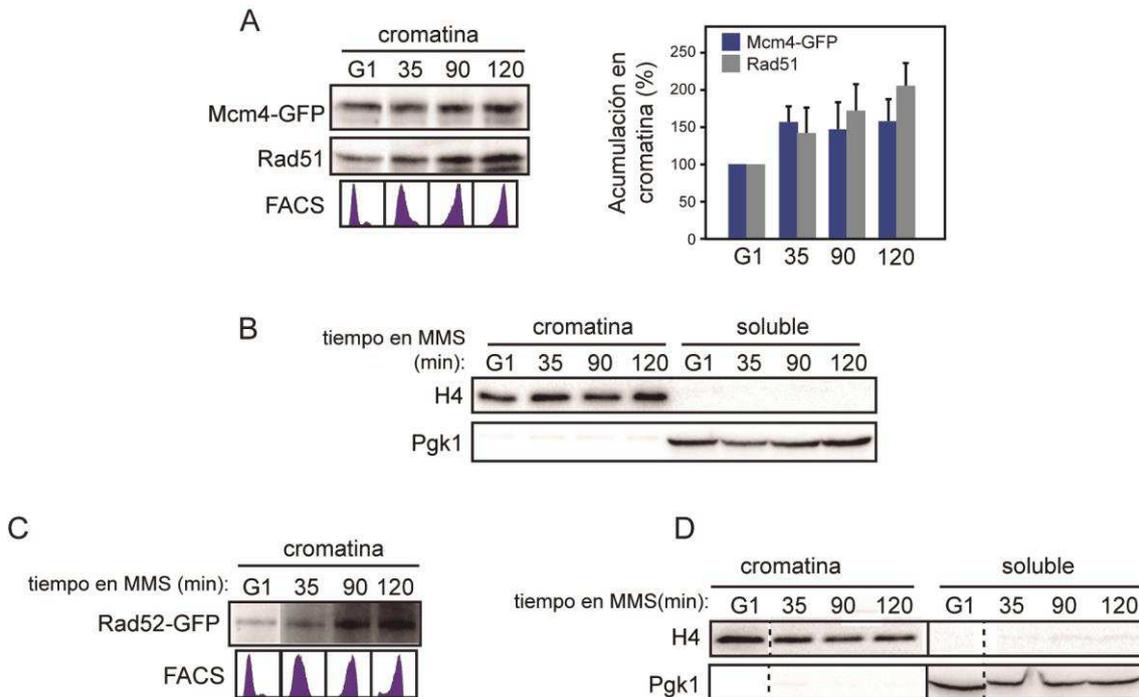


Figura 2.7. MCM2-7 y Rad51 tienen cinéticas de unión a la cromatina similares en presencia de MMS. Unión de Mcm4-GFP y Rad51 (A,B) y Rad52-GFP (C,D) a la cromatina mediante ensayos de fraccionamiento de cromatina y western blot de cultivos de células silvestres expresando Mcm4-GFP (A,B) o Rad52-GFP (C,D), sincronizados en G1 y liberados en medio fresco en presencia de MMS al 0,025% hasta G2/M. (B, D) Control del fraccionamiento de cromatina mediante western blot de Pgk1 y H4 de las fracciones cromatínica y soluble, respectivamente. (A) Se muestra la media y SEM de 9 experimentos independientes. La histona H4 se utilizó como control de carga de la fracción cromatínica. (B) El experimento se repitió dos veces con resultados similares. En cada caso se muestra el control del fraccionamiento y cinética de unión a la cromatina de un experimento representativo.

2.6 Las interacciones entre MCM2-7 y Rad51/Rad52 son necesarias para su unión a la cromatina en presencia de daño replicativo

Para determinar si la interacción física entre MCM2-7, Rad51 y Rad52 es importante para su mantenimiento en la cromatina en presencia de daño replicativo repetimos en primer lugar los fraccionamientos en presencia de 1NMPP1. Para ello se sincronizaron células *cdc7-as3* en G1 y se liberaron hasta G2/M en presencia de MMS al 0,025%, añadiéndose inhibidor o DMSO 35 minutos tras la salida de G1. La inactivación de la actividad quinasa de Cdc7 redujo significativamente la unión a la cromatina tanto de MCM2-7 como de Rad51 y Rad52 (Figura

2.8A). Posteriormente, realizamos el mismo análisis en células *cdc7-as3 mcm5-bob1*, las cuales mantienen la integridad del complejo en ausencia de Cdc7 (Figura 2.3A). Como se observa en la Figura 2.8E, *mcm5-bob1* suprimió el defecto en la unión a la cromatina dañada de MCM2-7 y Rad51 inducido por el inhibidor de Cdc7. Por tanto, el requerimiento de Cdc7 para el mantenimiento de MCM2-7, Rad51 y Rad52 en la cromatina replicada en presencia de daño refleja la necesidad de mantener la integridad del complejo MCM2-7/Rad51/Rad52.

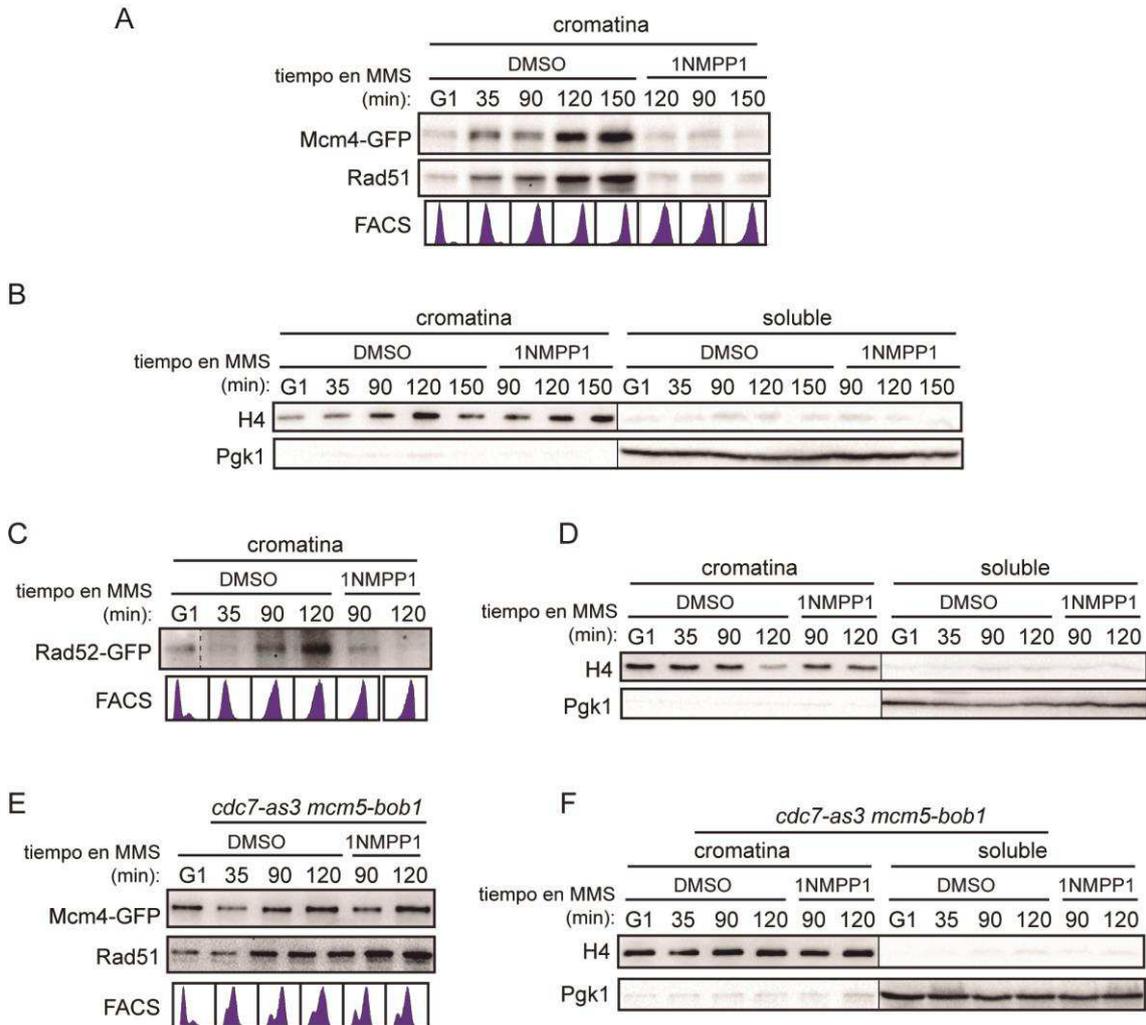


Figura 2.8. La integridad del complejo MCM2-7/Rad51/Rad52 es necesaria para el mantenimiento de estos factores en la cromatina replicada en presencia de MMS. Unión de Mcm4-GFP y Rad51 (A,B,E,F) y Rad52-GFP (C,D) a la cromatina mediante ensayos de fraccionamiento de cromatina y western blot en cultivos de células *cdc7-as3* expresando Mcm4-GFP (A,B,E,F) o Rad52-GFP (C,D) sincronizados en G1 y liberados en medio fresco en presencia de MMS al 0,025%. A los 35 minutos tras la liberación las células fueron tratadas con 1NMPP1 15 μ M o DMSO. (B,D,F) Controles de fraccionamiento de cromatina mediante western blot de Pgk1 y H4 de las fracciones cromatínica y soluble. La progresión a lo largo del ciclo se siguió mediante citometría de flujo. En cada caso se muestra el control de fraccionamiento y la cinética de unión a la cromatina de un experimento representativo. Los experimentos se repitieron 2 veces con resultados similares.

La unión de las proteínas Rad51 y Rad52 a las lesiones inducidas por MMS en el ADN también puede ser detectada mediante ChEC (Chromatin Endogenous Cleavage) [189]. Esta técnica se basa en la expresión de quimeras de las proteínas de HR con la MNasa. El dominio nucleasa de estas quimeras se puede activar con iones Ca^{2+} , aunque la concentración intracelular de Ca^{2+} no es suficiente para activar la MNasa [232]. Por tanto, para ver si una proteína está unida al ADN es necesario permeabilizar las células con digitonina, un detergente que no afecta a las interacciones proteína-ADN, y tratarlas con $CaCl_2$. La lógica de esta aproximación es que una proteína de reparación fusionada a la MNasa generará un corte detectable en el ADN si se une a una lesión que no es un DSB; si la lesión es un DSB, la quimera no aumentará el número de moléculas cortadas (Figura 2.9A). Por tanto, podemos inferir la unión de una proteína a la cromatina si el ADN se corta tras la exposición a Ca^{2+} [189].

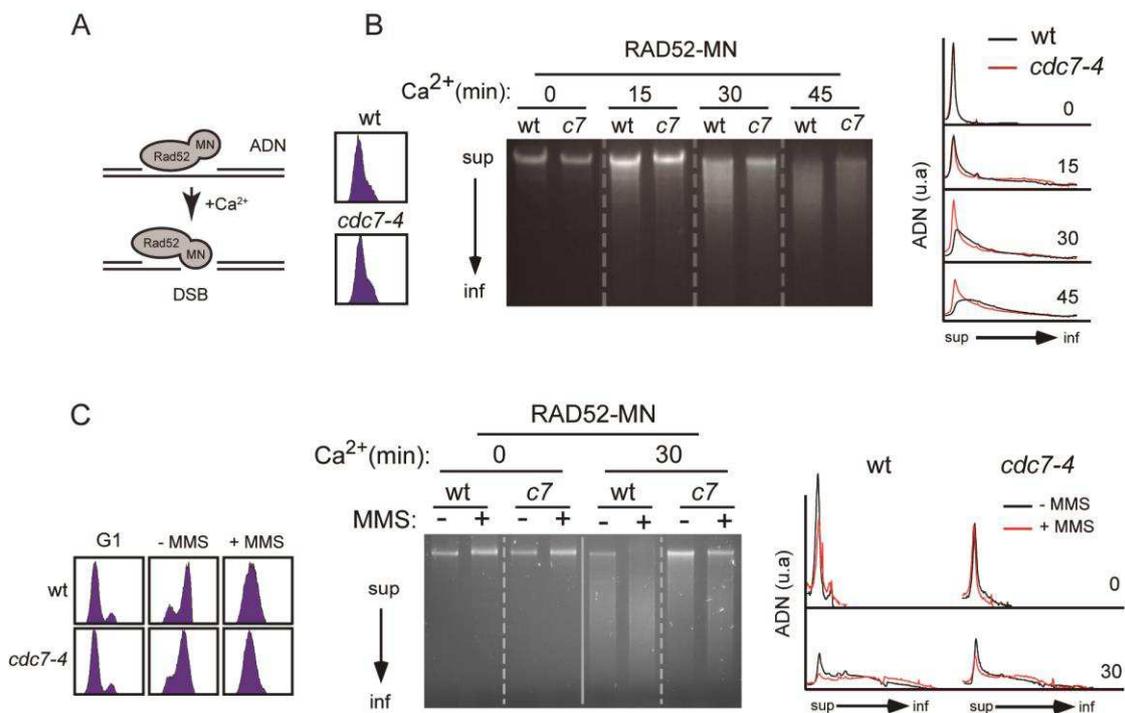


Figura 2.9. Cdc7 es necesario para la unión de Rad52 a las lesiones replicativas en el ADN. (A) Esquema de la aproximación experimental: en respuesta a Ca^{2+} , Rad52-MN inducirá un corte detectable sólo si está unida a una lesión que no es un DSB. (B,C) Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina en cultivos asincrónicos de células silvestres y *cdc7-4* tratadas durante 2 horas con MMS al 0.05% (B) o sincronizados en G1 y liberados en medio fresco en presencia o no de MMS al 0,033% durante 60 min (C). Los experimentos se realizaron a 26°C. Los paneles de izquierda y derecha muestran los perfiles de contenido de ADN y de digestión de ADN, respectivamente. Los experimentos se repitieron 3 (B) ó 2 (C) veces con resultados similares.

Esta aproximación experimental permitió demostrar la unión de Rad51 y Rad52 a fragmentos de ssDNA generados tras el encuentro de la horquilla con el ADN alquilado por MMS, así como el requerimiento de Rad52 para la unión de Rad51 [189]. La unión de Rad52 y posterior reparación de las lesiones en el ADN inducidas por MMS dependen de replicación [189]. Dado que Cdc7 es una proteína esencial para la iniciación de la replicación [18, 19], decidimos utilizar un alelo termosensible de Cdc7 (*cdc7-4*) a una temperatura semipermissiva (26°C), a la cual no muestra defectos replicativos significativos (Figura 2.10), pero su actividad quinasa es reducida como se deduce de los defectos que presenta tanto en la activación de Rad53 como en mutagénesis inducida por MMS (Figura 2.11, paneles A y C).

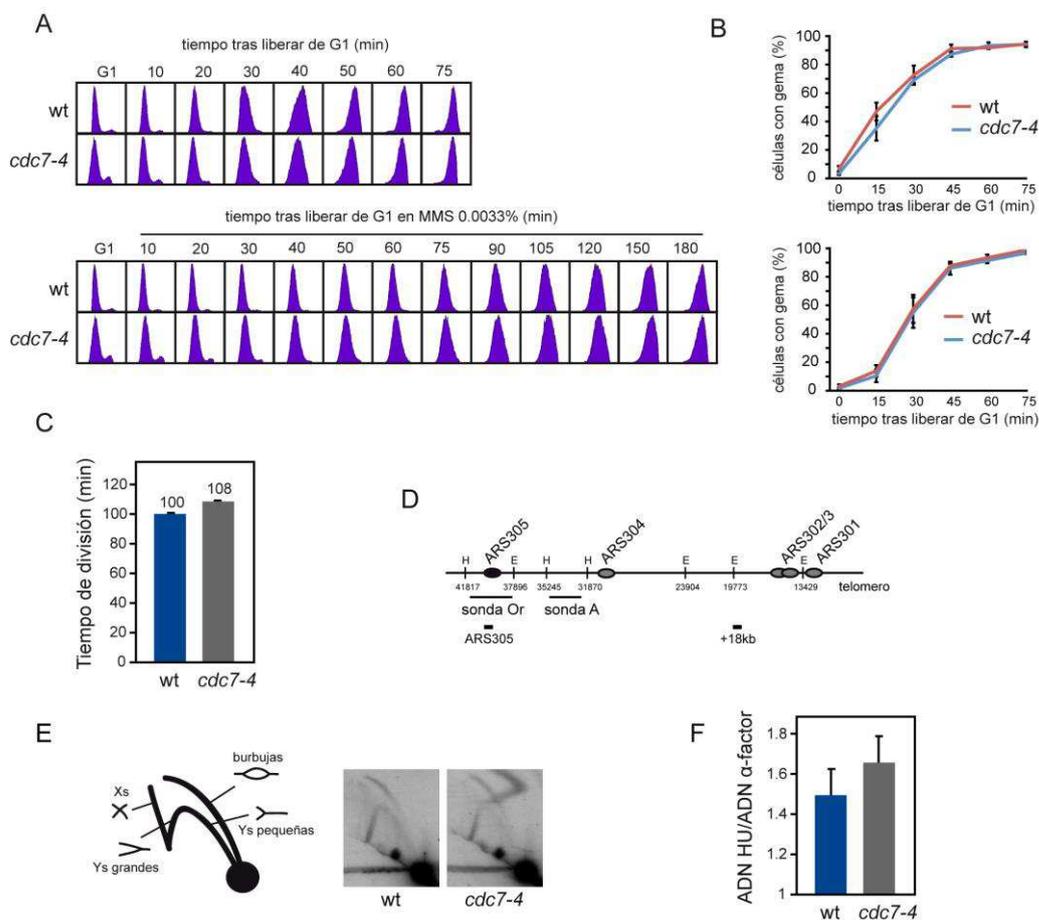


Figura 2.10. *cdc7-4* no presenta defectos replicativos a temperatura semipermissiva. Análisis de la progresión en el ciclo celular mediante estudios de contenido de ADN por FACS (A) y conteo de células gemadas (B), donde la aparición de la gema la entrada en fase S [233]. Los cultivos de células silvestres y *cdc7-4* se sincronizaron en G1 y se liberaron en presencia o ausencia de MMS 0,033%. *cdc7-4* mostró perfiles similares al silvestre en la progresión en fase S tanto en ausencia como en presencia de MMS. Los experimentos se repitieron dos veces con resultados similares. (C) Tiempo medio de división de cultivos silvestres y *cdc7-4* calculado como el tiempo necesario de un cultivo en fase exponencial para duplicar su densidad óptica. El mutante mostró un pequeño pero estadísticamente significativo (T-test no pareado, $p < 0,005$) aumento en el tiempo de generación respecto a la estirpe silvestre. Se muestra la

media y SEM de 3 experimentos independientes. (D) Esquema del origen de replicación *ARS305* con las sondas usadas en (E,F). (E) Análisis mediante geles bidimensionales de los intermediarios replicativos en el origen *ARS305* de cultivos de células silvestres y *cdc7-4* sincronizadas en G1 y liberadas durante 30 minutos en presencia de MMS al 0,033%. A la izquierda se muestra el patrón de intermediarios replicativos esperado tras cortar el origen con las enzimas *EcoRV* y *HindIII*. Para analizar estos intermediarios se usó la sonda Or (ver esquema en (D)). Como se observa, *cdc7-4* presentó un patrón de intermediarios replicativos similar al de la estirpe silvestre. (F) Eficiencia de iniciación de la replicación del origen *ARS305* determinada como la cantidad de ADN en el *ARS305* en células silvestres y *cdc7-4* sincronizadas en G1 y liberadas en fase S durante 60 min en presencia de HU 200 mM. La cantidad de ADN se determinó por PCR cuantitativa y se normalizó con un fragmento no replicado localizado a 18 kb del origen (305 +18 kb) mediante la siguiente fórmula $(60' \text{ ARS305} / 60' \text{ 305+18}) / (G1 \text{ ARS305} / G1 \text{ 305+18})$. Se muestra la media y la SEM de 3 experimentos independientes. *cdc7-4* mostró una eficiencia de iniciación similar a la estirpe silvestre. Todos los experimentos se realizaron a 26°C.

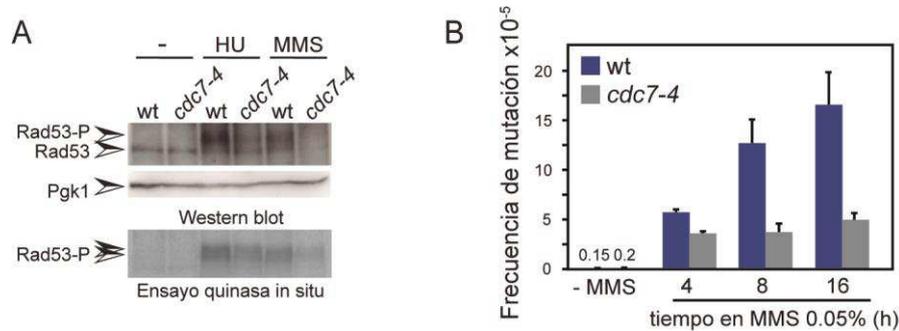


Figura 2.11. *cdc7-4* es defectivo en activación de Rad53 y mutagénesis inducida por MMS a temperatura semipermissiva. (A) Análisis por western blot (arriba) y ensayo quinasa (abajo) de la fosforilación de Rad53 en cultivos asincrónicos de células silvestres y *cdc7-4* en respuesta a HU 200 mM y MMS 0,05% durante 2 horas. Como control de carga se usó Pgk1. (B) Frecuencia de mutación de cultivos asincrónicos de células silvestres y *cdc7-4* tratados o no con MMS al 0.05 % durante los tiempos indicados. Se muestra la media y la SEM de 3 experimentos independientes. Los experimentos se realizaron a 26°C.

Por tanto, analizamos la unión de Rad52-MN a la cromatina en mutantes *cdc7-4* a temperatura semipermissiva. Como puede observarse en la Figura 2.9B en la estirpe silvestre, el tratamiento de las células con MMS aumentó tanto la cinética como la extensión de la digestión del ADN por Rad52-MN. El mutante *cdc7-4* suprimió parcialmente la unión de Rad52-MN al daño replicativo como se infiere del menor grado de digestión del ADN en comparación con la estirpe silvestre. Resultados similares se obtuvieron mediante ChEC de cultivos sincrónicos liberados en presencia de MMS al 0,033% (Figura 2.9C), lo que descarta la posibilidad de que el defecto de *cdc7-4* en la unión de Rad52-MN a la cromatina sea debido a diferencias en la fase del ciclo celular. Estos resultados son consistentes con el requerimiento de actividad quinasa de Cdc7 para el mantenimiento de Rad52 y Rad51 en la cromatina en

presencia de MMS medido mediante fraccionamiento de cromatina y western blot (Figura 2.8A y 2.8C).

Con objeto de confirmar que la pérdida de unión de Rad52-MN a la cromatina dañada en *cdc7-4* era debido a defectos en la interacción entre MCM2-7 y Rad51/Rad52, analizamos en este mutante estas interacciones mediante coimmunoprecipitación. Como se observa en la Figura 2.12 el mutante afectó significativamente a la interacción entre Mcm4-GFP con Rad52, pero no con Rad51, lo que sugiere que estas interacciones están reguladas por diferentes dianas de fosforilación.

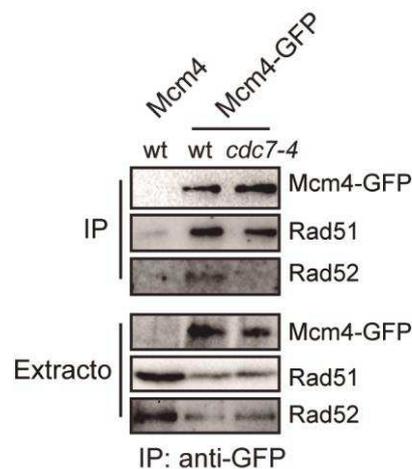


Figura 2.12. *cdc7-4* afecta a la interacción entre MCM2-7 y Rad52 a temperatura semipermissiva. Coimmunoprecipitación de Mcm4-GFP, Rad51 y Rad52 en extractos tratados con MNasa de cultivos asincrónicos de células silvestres y *cdc7-4* que expresan Mcm4-GFP. El experimento se realizó a 26°C. Como control negativo se usó una estirpe Mcm4. El experimento se repitió 4 veces con resultados similares.

2.7 El efecto de *cdc7-4* en la unión de Rad52 a la cromatina dañada no está asociado a defectos replicativos

El hecho de que el origen *ARS305* se active con la misma eficiencia en células silvestres y *cdc7-4* (Figura 2.10E) nos permitió analizar la unión de Rad52 a la cromatina replicada por horquillas que iniciaron eficientemente la replicación desde este origen. Para ello, el ADN de cultivos asincrónicos incubados o no con MMS al 0,05% durante 2 horas se trató mediante ChEC, se transfirió a una membrana y se hibridó con sondas específicas del ADN replicado desde el *ARS305*. Como se observa en la Figura 2.13, *cdc7-4* suprimió parcialmente la unión de Rad52-MN a las lesiones replicadas a partir de este origen. Este dato, junto con la ausencia de problemas replicativos globales (Figura 2.10), demuestra que la reducción en la unión de

Rad52 a la cromatina en respuesta a MMS no está asociado a defectos en la replicación de *cdc7-4* a 26°C.

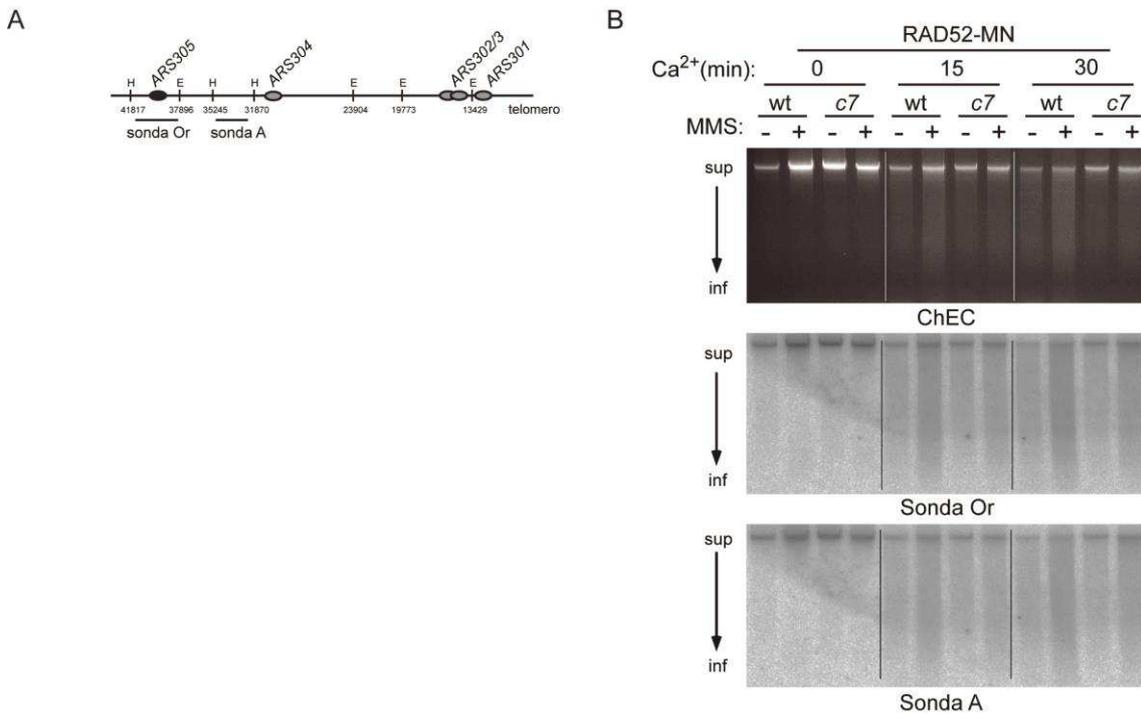


Figura 2.13. El defecto de *cdc7-4* en la unión de Rad52 a los daños inducidos por MMS no está asociado con problemas replicativos. (A) Esquema de la región replicada desde el origen *ARS305* hasta el telómero, donde se muestran las sondas usadas. (B) Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN al ADN replicado desde el *ARS305* de cultivos asincrónicos de células silvestres y *cdc7-4* tratados o no con MMS al 0,05% durante 2 horas a 26°C. El ADN total (panel superior) se transfirió a una membrana y se hibridó con las sondas Or (panel central) y A (panel inferior).

2.8 El papel de *Cdc7* en HR es independiente de sus funciones en el checkpoint y en TLS

Nos preguntamos si el defecto en la unión de Rad52 al ADN alquilado estaba asociado a los problemas que *cdc7-4* presentaba en la activación del checkpoint y/o en TLS a temperatura semipermissiva (Figura 2.11). En contra de esta posibilidad, observamos mediante ChEC que la ausencia de Mec1, esencial para la activación de Rad53, no afectó a la unión de Rad52-MN al daño replicativo (Figura 2.14A). De igual manera, el análisis mediante ChEC de un mutante completamente defectivo en TLS (*rev1Δ rev3Δ rad30Δ*) no mostró ningún defecto en la unión de Rad52-MN a la cromatina dañada (Figura 2.14B). En conjunto, nuestros datos sugieren que el defecto de *cdc7-4* en la unión de Rad52 al daño replicativo es independiente de los defectos del mutante en checkpoint y TLS.

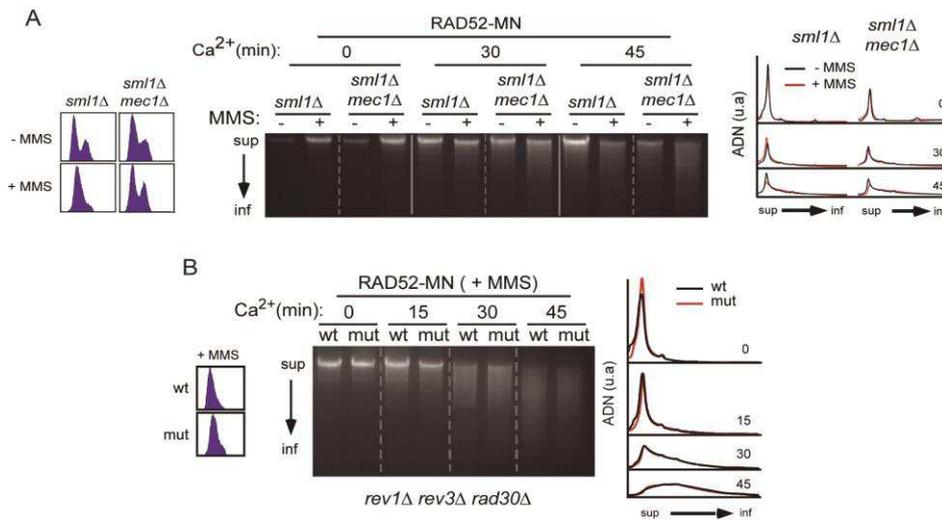


Figura 2.14. El papel de Cdc7 en la unión de Rad52 al daño replicativo es independiente de sus funciones en checkpoint y TLS. (A, B) Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina en cultivos asincrónicos de células *sml1Δ*, *sml1Δ mec1Δ* (A), silvestres y *rev1Δ rev3Δ rad30Δ* (B) tratados o no con MMS al 0,05% durante 2 horas. Los paneles de izquierda y derecha muestran los perfiles de contenido de ADN y de digestión de ADN, respectivamente. Los experimentos se repitieron 2 veces con resultados similares.

2.9 La fosforilación de las serinas 164 y 170 de Mcm2 mediada por Cdc7 es necesaria para la unión de Rad52 a las lesiones replicativas en el ADN

Los resultados obtenidos muestran que la actividad quinasa de Cdc7 es necesaria para la integridad del complejo MCM2-7/Rad51/Rad52 y su estabilización en el daño replicativo. Recientemente, se ha descrito que la fosforilación por Cdc7 de Mcm2 en las serinas 164 y 170, aunque esenciales para la viabilidad de la célula [21, 29], pueden ser prescindibles tanto en presencia de la mutación *mcm5-bob1* como de otro supresor que aún no ha sido caracterizado [28, 29]. En este último fondo genético el mutante no fosforilable (*mcm2_{AA}*) es ligeramente sensible a MMS [29]. En primer lugar confirmamos que este alelo fosfomutante no afectaba a la tasa de mutagénesis inducida por MMS (Figura 2.15), lo que sugiere que el mecanismo por el cual *Mcm2-S164,170-P* promueve la resistencia a MMS no está relacionado con el papel de Cdc7 en TLS.

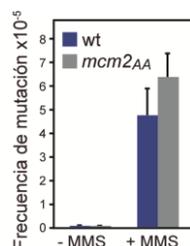


Figura 2.15. *mcm2_{AA}* no afecta a la frecuencia de mutagénesis inducida por MMS. Frecuencia de mutación de cultivos asincrónicos de células silvestres y *mcm2_{AA}* tratados o no con MMS al 0.05% durante 4 horas.

Por tanto, decidimos valorar la posibilidad de que la sensibilidad a MMS de *mcm2_{AA}* fuera consecuencia de un defecto en la unión de Rad52 a la cromatina en presencia de daño. El análisis mediante ChEC mostró que la estirpe *mcm2_{AA}* suprime parcialmente la unión de Rad52-MN a las lesiones replicativas inducidas por MMS (Figura 2.16A). Por el contrario, un mutante que mimetiza la fosforilación de Mcm2 de forma constitutiva (*mcm2_{EE}*) mostró un perfil similar al de la estirpe silvestre. Estos datos sugieren que el papel de Cdc7 en la unión de Rad52 en el daño replicativo está mediado por la fosforilación de Mcm2-S164,170. Para demostrarlo, analizamos el efecto de *mcm2_{EE}* sobre la unión de Rad52-MN al ADN en la estirpe *cdc7-4* a temperatura semipermissiva. El mutante fosfomimético *mcm2_{EE}* suprimió parcialmente el defecto de unión de Rad52 a los daños replicativos inducido por *cdc7-4* a temperatura semipermissiva (Figura 2.16B), indicando que Cdc7 promueve unión de Rad52 a las lesiones replicativas en el ADN al menos en parte mediante la fosforilación de la subunidad Mcm2 de la helicasa MCM2-7 en las serinas 164 y 170.

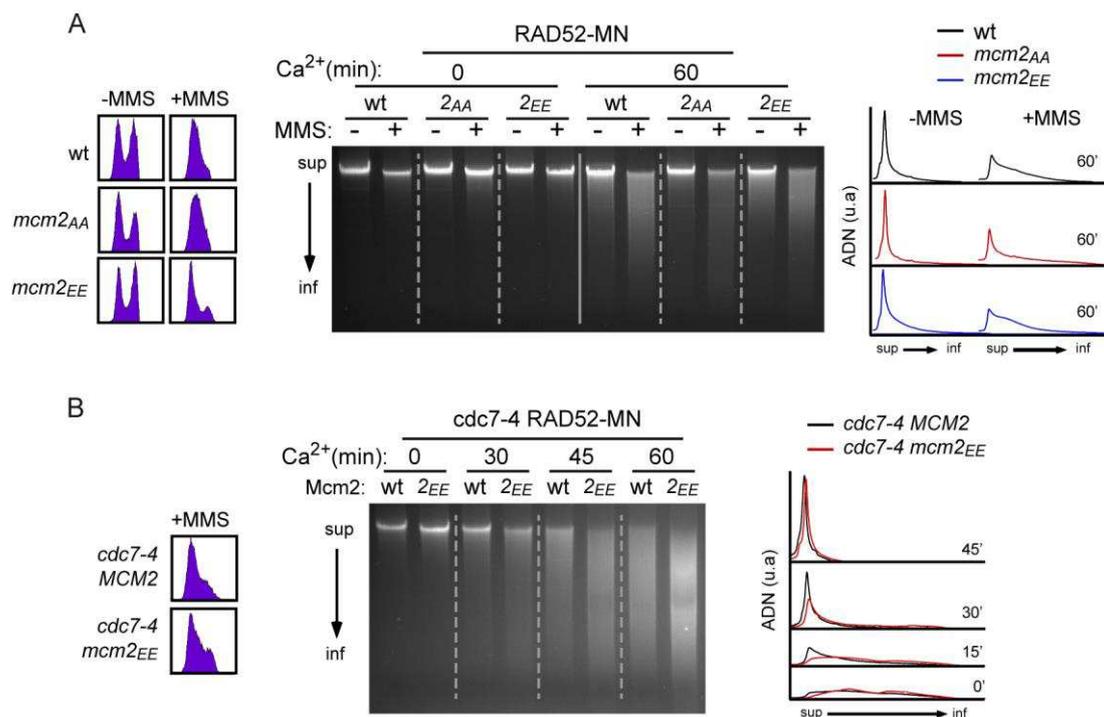


Figura 2.16. La fosforilación de las serinas 164 y 170 de Mcm2 por Cdc7 es necesaria para la unión de Rad52 en el daño replicativo. (A) Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina en cultivos asincrónicos de células silvestres, fosfomutantes (*mcm2_{AA}*) o fosfomiméticos (*mcm2_{EE}*) de Mcm2 tratadas o no con MMS 0,05% durante 2 horas. (B) Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina en cultivos asincrónicos de células *cdc7-4* y *cdc7-4 mcm2_{EE}* en presencia de MMS al 0.05% durante 2 horas a 26°C. Los paneles de izquierda y derecha muestran los perfiles de contenido celular de ADN y de digestión de ADN por Rad52-MN, respectivamente. Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

2.10 Cdc7 no regula la unión de Rad52 a la horquilla replicativa

La unión de Rad52 a la horquilla de replicación es independiente de daño [149, 189], y es necesaria para la progresión de la horquilla de replicación en presencia de MMS [189]. La unión de Rad52 a la horquilla puede ser detectada mediante el análisis de intermediarios replicativos por geles bidimensionales de células tratadas por ChEC (2D/ChEC). La unión y corte de la horquilla replicativa por Rad52-MN causa una reducción en la cantidad de burbujas al ser convertidas en moléculas con forma de Y pequeña (Figura 2.17A) [189]. El análisis del fragmento que contiene el origen de replicación temprano *ARS305* mediante 2D/ChEC mostró un patrón similar de intermediarios replicativos en respuesta a Ca^{2+} en las estirpes *cdc7-4* y silvestre a 26°C (Figura 2.17B), lo que sugiere que Cdc7 no es necesario para la unión de Rad52 a la horquilla.

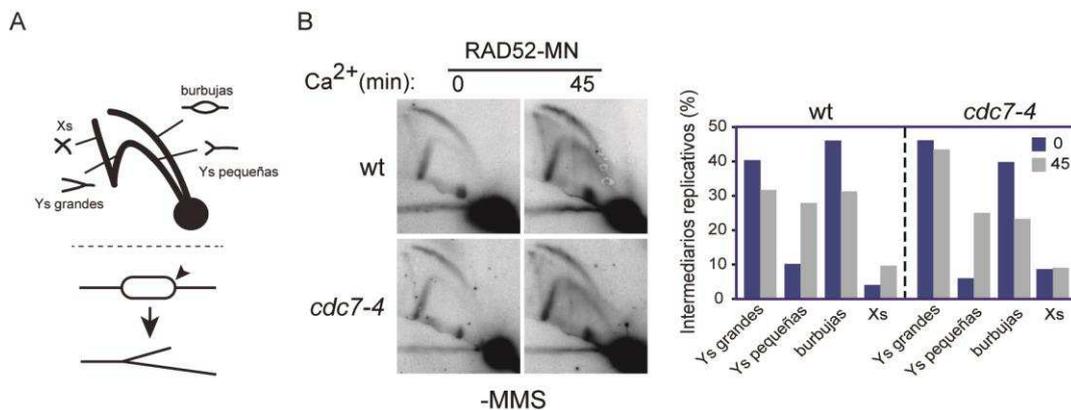


Figura 2.17. Cdc7 no regula la unión de Rad52-MN a la horquilla replicativa. (A) Esquema del perfil de migración de los diferentes intermediarios replicativos mediante geles bidimensionales (arriba). Esquema de la molécula Y corta esperada tras el corte de una burbuja replicativa por Rad52-MN (abajo). (B) Análisis mediante 2D/ChEC de células silvestres y *cdc-4* sincronizadas en G1 y liberadas en medio fresco durante 30 min a 26°C. El ADN extraído se digirió con *EcoRV* y *HindIII* y se analizó en geles bidimensionales. En la gráfica se muestra el porcentaje de intermediarios replicativos. El experimento se repitió 2 veces con resultados similares.

2.11 Cdc7 es necesario para la formación de SCJs inducidas por MMS

La reparación recombinogénica de lesiones inducidas por MMS está asociada con la formación de uniones entre cromátidas hermanas (SCJs) que pueden ser detectadas en el arco de estructuras con forma de X en geles bidimensionales (Figura 2.18, izquierda) en células deficientes en el complejo Sgs1/Top3/Rmi1 necesario para “disolverlas” [210]. Dado que la formación de estas estructuras depende de Rad52 y Rad51 [210], analizamos mediante geles bidimensionales la formación de SCJs en cultivos de mutantes *sgs1Δ* y *sgs1Δ cdc7-4*

sincronizados en G1 y liberados en presencia de MMS al 0,033% a temperatura semipermissiva. *cdc7-4* dio lugar a una reducción significativa en la acumulación de SCJs (Figura 2.18, derecha), lo que sugiere que Cdc7 contribuye a la formación de SCJs a través de su papel en la unión de Rad52 y Rad51 en los daños replicativos.

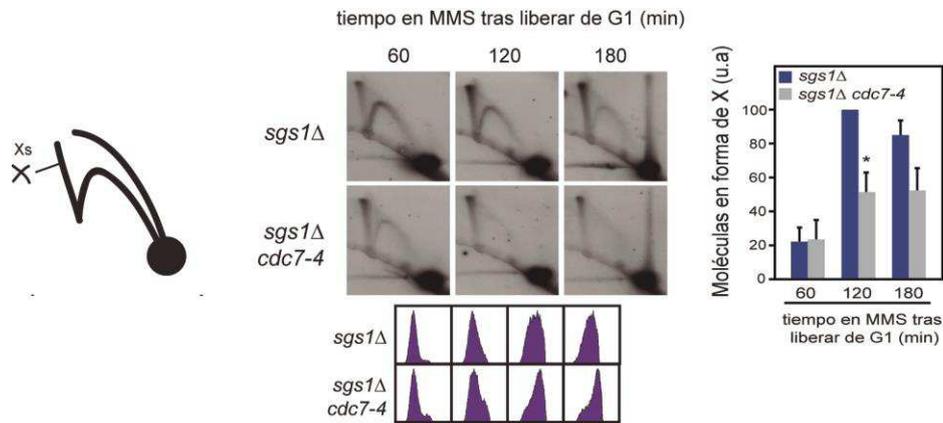


Figura 2.18. Cdc7 es necesario para la formación de SCJs inducidas por MMS. Análisis de estructuras en forma de X mediante geles bidimensionales de cultivos de células *sgs1Δ* y *cdc7-4 sgs1Δ* sincronizados en G1 y liberados en medio fresco en presencia de MMS al 0,033% a 26°C. A la izquierda se muestra un esquema de la posición relativa de las estructuras en X. La progresión del ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo. Se muestra la media y la SEM de 5 experimentos independientes. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa según un T- test pareado ($p < 0.02$).

Debido a que el defecto de *cdc7-4* en la unión de Rad52 está mediado por la fosforilación de Mcm2 en las serinas 164 y 170 nos preguntamos si el mutante *mcm2_{AA}* compartía los defectos *cdc7-4* en la formación de SCJs. El análisis de los intermediarios replicativos mediante geles bidimensionales de células *sgs1Δ* y *sgs1Δ mcm2_{AA}*, no mostró defectos del mutante en la formación de SCJs en estas condiciones (Figura 2.19).

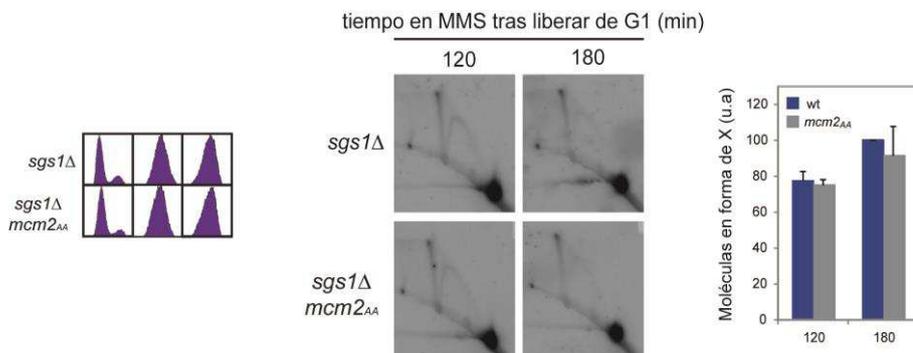


Figura 2.19. *mcm2_{AA}* no afecta a la formación de SCJs inducidas por MMS. Análisis de estructuras en forma de X mediante geles bidimensionales de cultivos de células *sgs1Δ* y *sgs1Δ mcm2_{AA}* sincronizados en G1 y liberados en medio fresco en presencia de MMS al 0,033%. La progresión del ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo. Se muestra la media y la SEM de tres experimentos independientes.

2.12 Cdc7 es necesario para la reparación recombinacional inducida por MMS

La reparación mediante HR de DSBs está asociada a centros de reparación que pueden ser detectados con proteínas de recombinación fusionadas con proteínas fluorescentes [234-236]. De manera similar, la reparación de los huecos de ssDNA generados por MMS ocurre en centros de reparación detectables por microscopía de fluorescencia [234]. De hecho, la unión de Rad51 a las lesiones replicativas puede ser detectada durante la fase S en células que expresan Rad51-YFP por la acumulación de múltiples focos pequeños y tenues, que dan lugar a 1 ó 2 focos brillantes de reparación cuando la replicación ha terminado [189]. Dado que *cdc7-4* afecta a la unión de Rad52 a los daños durante la fase S, decidimos analizar si estaba afectado en la formación de focos. La unión de Rad52 al daño replicativo en *cdc7-4* fue suficiente para formar focos de Rad52 y Rad51, tanto replicativos como reparacionales (Figura 2.20A y 2.20B; datos no mostrados).

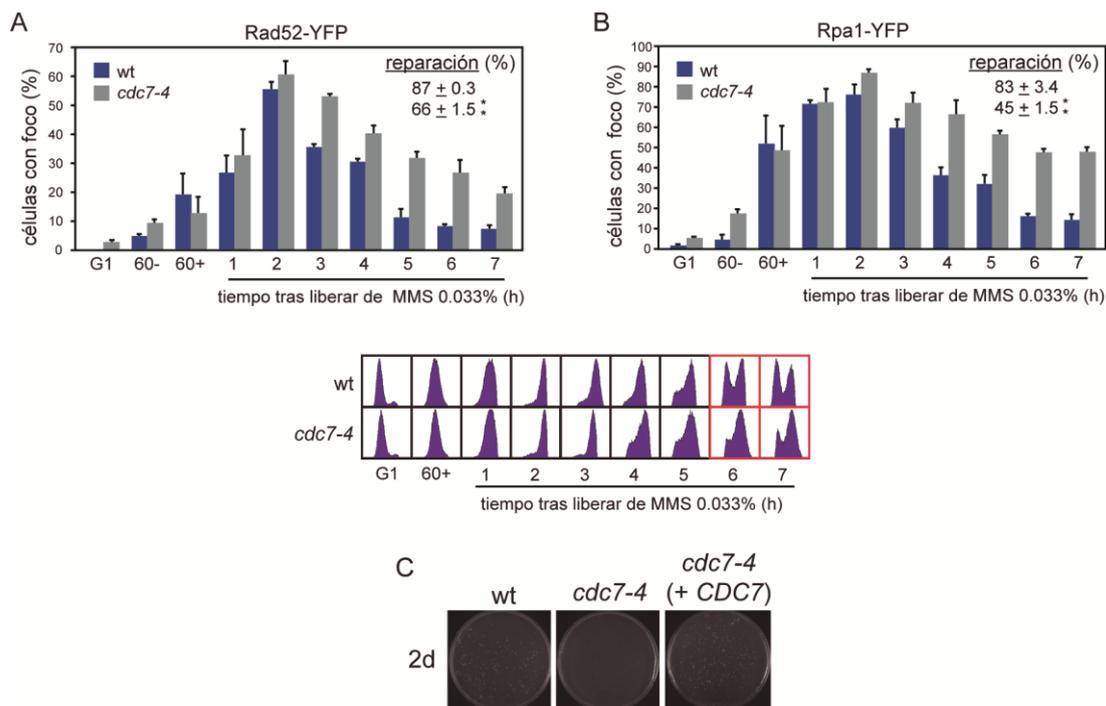


Figura 2.20. *cdc7-4* es defectivo en la reparación recombinacional de las lesiones replicativas. (A) Cinética de acumulación de focos de Rad52-YFP de cultivos de células silvestres y *cdc7-4* a 26°C mediante microscopía de fluorescencia. Los cultivos se sincronizaron en G1 y liberaron en presencia o ausencia de MMS al 0.033% durante 60 min, tras los cuales el MMS se inactivó y los cultivos se volvieron a liberar en medio fresco. (B) Cinética de acumulación de focos de Rpa1-YFP en células silvestres y *cdc7-4*. Se llevó a cabo en las mismas condiciones de (A). Las gráficas muestran la media y la SEM de 3 experimentos independientes. Los asteriscos muestran una diferencia estadísticamente significativa según un T-test pareado ($p < 0.005$). En el interior de las gráficas se muestra el porcentaje de reparación después de 7 horas tras liberar de MMS. La progresión a lo largo del ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo. En rojo se señala el retraso en la salida de mitosis que sufren los mutantes *cdc7-4*. (C) Tamaño de las colonias de células silvestres y *cdc-4* transformadas con pRS416 ó pRS416CDC7 tras la exposición a MMS al 0,05% durante 24 h.

Nos preguntamos, por tanto, si esos centros eran competentes en reparación recombinacional. Para ello, las células se sincronizaron en G1 y se liberaron en medio fresco en presencia o ausencia de MMS al 0,033% durante 1 hora; a continuación el MMS se inactivó y las células se liberaron en medio fresco durante distintos tiempos para seguir la acumulación y posterior desaparición de los focos de Rad52-YFP como un marcador del proceso de reparación. A las 2 horas tras la inactivación del MMS y coincidiendo con la finalización de la replicación se alcanzó el pico máximo de células con focos de Rad52 (55-60%). Mientras que el porcentaje de células con focos descendió en la estirpe silvestre en torno al 8% en 3 horas, el porcentaje no bajó del 20% tras 5 horas en la estirpe *cdc7-4* (Figura 2.20A), lo que sugiere que Cdc7 es necesario para la reparación por recombinación homóloga de las lesiones replicativas inducidas por MMS.

Para confirmar que la actividad quinasa de Cdc7 es necesaria para la reparación recombinacional de las lesiones replicativas en el ADN repetimos las cinéticas de acumulación de focos de Rad52-YFP en el mutante *cdc7-as3*. Para ello, las células se sincronizaron en G1 y se liberaron en presencia de MMS al 0,033% durante 60 minutos, tras los cuales el MMS fue inactivado y las células liberadas en medio fresco. Como en experimentos anteriores, el inhibidor de Cdc7 se añadió a los 35 minutos tras la liberación de G1 para que se iniciara la replicación. Además, se añadió en este punto factor α , con el objetivo de prevenir la entrada de las células en un nuevo ciclo, ya que defectos en la iniciación de la replicación por ausencia de actividad DDK dan lugar a focos de Rad52 [221]. En estas condiciones la inactivación de Cdc7 no dio lugar a un incremento significativo de células con focos de Rad52 en ausencia de daño (Figura 2.21A). En presencia de MMS, la inactivación de Cdc7 retrasó ligeramente la progresión de la fase S, como podemos observar en el análisis del contenido de ADN por citometría de flujo, y en consecuencia el pico de acumulación de focos de Rad52-YFP (Figura 2.21B). Al igual que con *cdc7-4*, la inactivación de la actividad quinasa de Cdc7 redujo significativamente la tasa de reparación.

Posteriormente decidimos analizar si la función de Cdc7 en HR era necesaria más allá de la fase S, ya que aunque Rad52 se une a los huecos de ssDNA durante esta fase, los centros de reparación de recombinación homóloga no se forman hasta que las células finalizan la replicación [189]. Para ello, los experimentos se llevaron a cabo sincronizando las células en G1 y liberándolas en presencia de MMS al 0,033% durante 60 minutos. A diferencia del experimento anterior, el inhibidor de Cdc7 no se añadió hasta 60 minutos después de la inactivación del MMS cuando la mayor parte de las células han completado la replicación (Figura 2.21). Aunque algo inferior, la inactivación de Cdc7 en G2/M también redujo la tasa de

reparación (Figura 2.21C), lo cual sugiere que Cdc7 tiene un papel postreplicativo durante la reparación recombinacional de los daños inducidos por MMS.

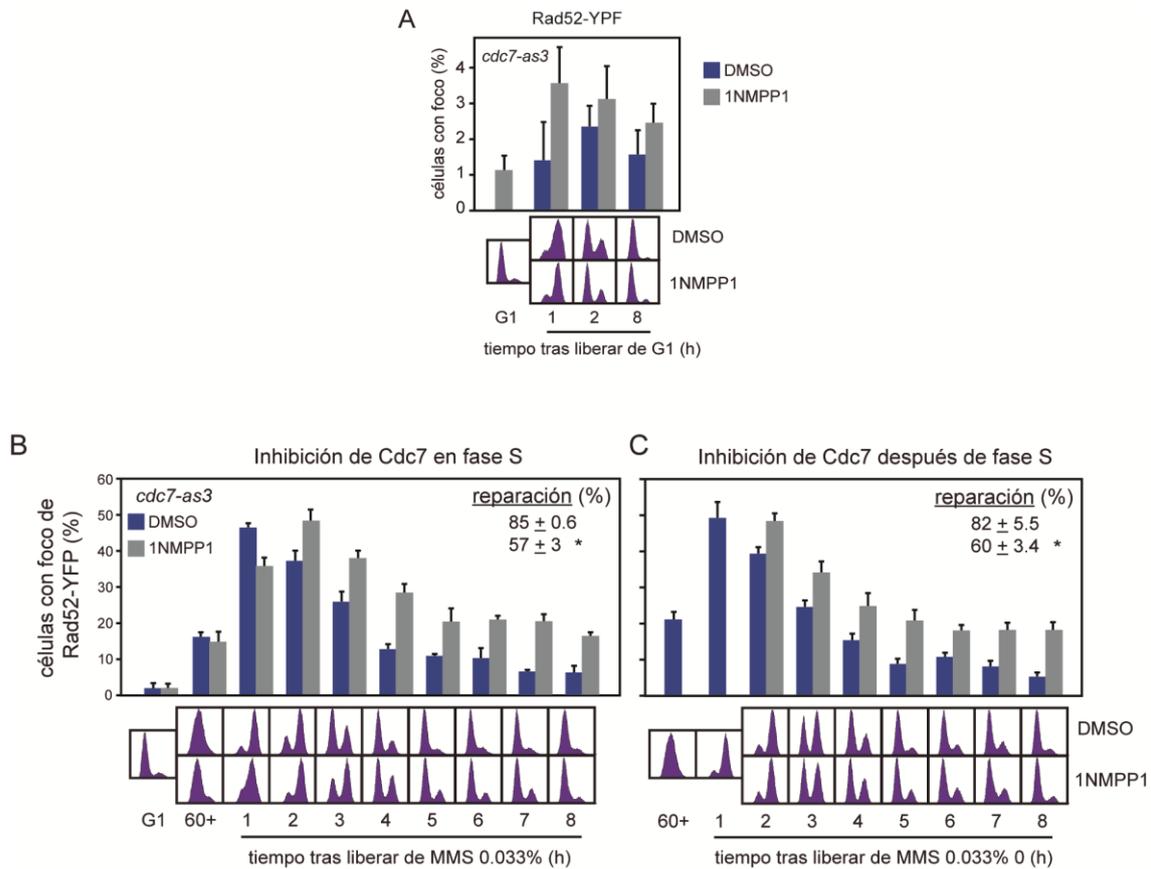


Figura 2.21. La actividad quinasa de Cdc7 es necesaria para la recombinación homóloga inducida por MMS durante la fase S y G2/M. Cinética de acumulación de focos de Rad52-YFP en células *cdc7as3* transformadas con el plásmido pWJ1344 (*RAD52-YFP*) mediante microscopía de fluorescencia. Los cultivos se sincronizaron en G1 y liberaron en ausencia de daño (A) o en presencia de MMS al 0,0033% (B, C) durante una hora tras la cual el MMS fue inactivado y los cultivos se volvieron a liberar en medio fresco. A los 35 minutos (A, B) o a los 120 min (C), tras la liberación el cultivo se dividió en dos, y se trataron con 1NMPP1 a 15 μ M o DMSO. El inhibidor (o DMSO) se reañadió cada 2 horas. De igual manera los cultivos se trataron tras la liberación del MMS con factor α cada 2 horas para evitar la iniciación de la replicación en el siguiente ciclo. En el interior de las gráficas se muestra el porcentaje de reparación después de 7 horas tras liberar de MMS. La progresión a lo largo del ciclo se siguió mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran la media y la SEM de 3 experimentos independientes. El asterisco muestra una diferencia estadísticamente significativa según un T-test pareado ($p < 0.02$).

Los tramos de ssDNA generados durante el proceso de DDT son recubiertos por el complejo RPA (formado por Rpa1-Rpa2-Rpa3). Al igual que Rad52-YFP, Rpa1-YFP es una quimera funcional que puede ser detectada tanto en focos de replicación como de reparación [234]. En ausencia de HR los fragmentos de ssDNA son reclutados a los centros de reparación

pero no son reparados [189]. Por tanto, *cdc7-4* debería acumular focos de RPA como consecuencia de sus defectos en HR. La cinética se llevó a cabo en las mismas condiciones que el experimento anterior (Figura 2.20A), pero utilizando en este caso estirpes con la quimera Rpa1-YFP. Como se observa en la cinética de reparación (Figura 2.20B) se pasó de un ~80% de células con focos de RPA a las 2 horas tras la inactivación del MMS un ~45% en *cdc7-4* frente al ~15% en la estirpe silvestre 5 horas después. En conclusión, nuestros resultados sugieren que Cdc7 es necesario para el relleno por recombinación homóloga de los huecos de ssDNA dejados atrás de la horquilla replicativa durante la DDT. Consistente con esta función, el análisis del ciclo celular por citometría de flujo mostró una parada en G2/M, y el consiguiente retraso en la progresión al siguiente ciclo en el mutante *cdc7-4* (Figura 2.20). Este retraso se observa claramente en el tamaño de las colonias tras 24 horas de crecimiento en placa tras una exposición de 8 horas en medio líquido con 0,05% de MMS (Figura 2.20C).

Posteriormente, nos preguntamos si el mutante *mcm2_{AA}* compartía estos defectos en reparación recombinacional inducida por MMS. Para ello se repitió la cinética de acumulación de focos de Rad52-YFP en las mismas condiciones de la Figura 2.20. Como se observa en la Figura 2.22, la cinética de reparación fue similar en las estirpes silvestre y *mcm2_{AA}*.

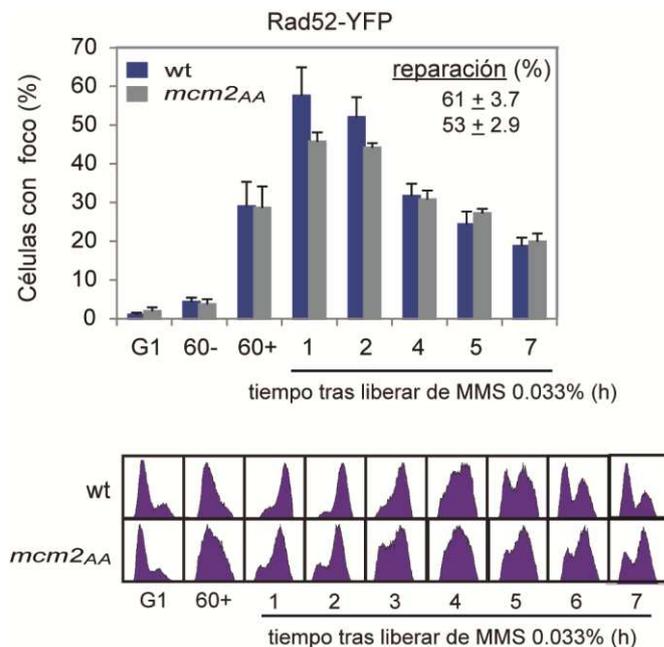


Figura 2.22. *mcm2_{AA}* no es defectivo en reparación recombinacional inducida por MMS. Cinética de acumulación de focos de Rad52-YFP de cultivos de células silvestres y *mcm2_{AA}* transformados con el plásmido pWJ1344 (*RAD52-YFP*), sincronizados en G1 y liberados en presencia de MMS al 0.033% durante 60 min, tras los cuales el MMS se inactivó y los cultivos se volvieron a liberar en medio fresco.

Los mutantes *rad52Δ* son muy sensibles a MMS como consecuencia de la pérdida de las rutas de reparación recombinacional. Sin embargo, *cdc7-4* es apenas sensible a MMS a

temperatura semipermissiva (Figura 2.23A), lo que sugiere que el defecto que presenta en la unión de Rad52 no es suficiente para generar problemas de viabilidad en presencia de daño replicativo. De acuerdo con este argumento, *cdc7-4* tampoco mostró defectos de recombinación homóloga inducida por MMS a temperatura semipermissiva (Figura 2.23B).

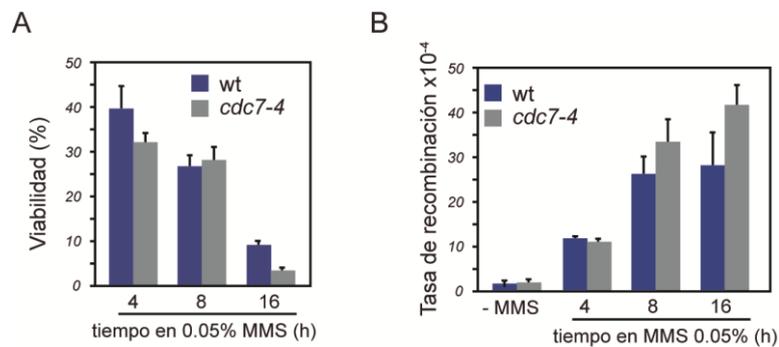


Figura 2.23. *cdc7-4* es resistente a MMS y proficiente en recombinación genética. (A) Viabilidad de células silvestres y *cdc7-4* en respuesta a MMS. Se presenta el porcentaje de células capaces de formar colonias tras la exposición a MMS al 0,05% respecto a las células totales previas a la exposición con MMS. (B) Frecuencia de recombinación entre repeticiones invertidas de células silvestres y *cdc7-4* transformadas con el plásmido pRS316-SU. (A,B) Se muestra la media y la SEM de 3 experimentos independientes. Los experimentos se realizaron a 26°C.

3. RESULTADOS: PARTE 2

3.1 Asf1 es necesario para la unión de Rad52 al daño replicativo

La progresión de la horquilla replicativa requiere una estrecha coordinación entre los procesos de síntesis de ADN y de deposición de histonas. La chaperona de histonas Asf1 juega un papel clave en este proceso mediante su interacción con la helicasa MCM2-7. Además Asf1 promueve la acetilación por Rtt109 de la lisina 56 de la histona H3 (H3K56ac), siendo esta modificación esencial para la respuesta recombinacional a daños replicativos pero no de DSBs [233, 237]. Decidimos por tanto analizar el papel de Asf1 en la unión de Rad52 a los daños replicativos. El análisis mediante ChEC de cultivos asincrónicos tratados o no con MMS durante 2 horas mostró que Asf1 es necesario para la unión de Rad52 en los daños (Figura 3.1A). Debido a que *asf1Δ* se acumula en metafase como consecuencia de la activación del checkpoint de fase S [92], decidimos analizar si el defecto en la unión de Rad52 era debido a diferencias de ciclo. Para ello se analizó la unión de Rad52 a la cromatina mediante ChEC en cultivos sincronizados en G1 y liberados en presencia o ausencia de MMS al 0,033% durante 60 minutos (Figura 3.1B). La pérdida de unión de Rad52 a los daños replicativos en el mutante *asf1Δ* se mantuvo en cultivos con el mismo perfil de ciclo celular.

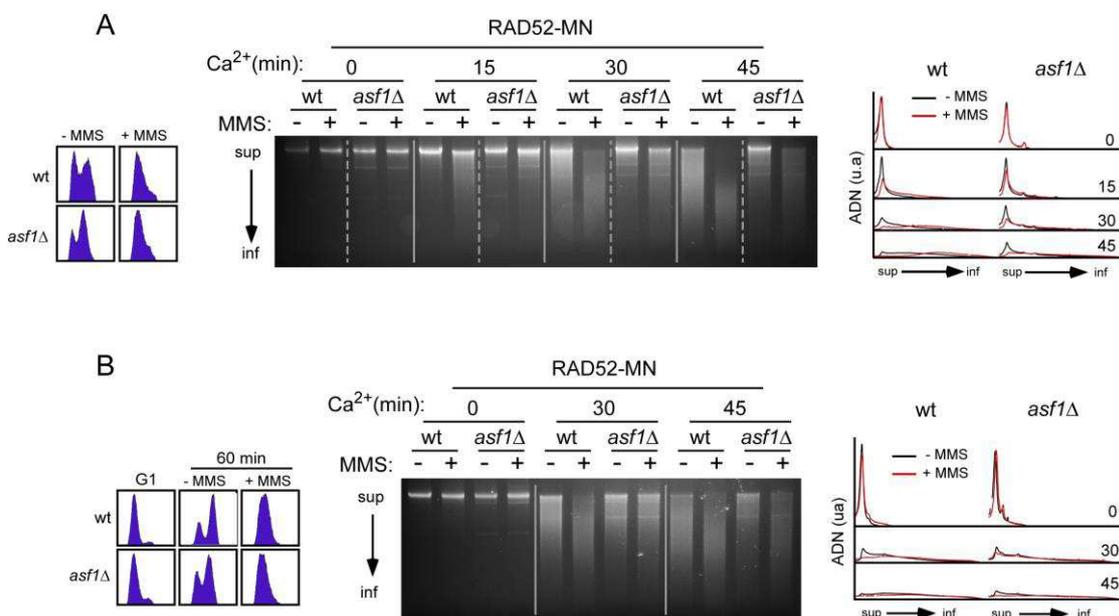


Figura 3.1 Asf1 es necesaria para la unión de Rad52 a los daños replicativos. Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina de cultivos asincrónicos de células silvestres y *asf1Δ* tratados o no durante 2 horas con MMS al 0,05% (A) o sincronizados en G1 y liberados en medio fresco en presencia o no de MMS al 0,033% durante 60 min (B). Los paneles de izquierda y derecha muestran los perfiles de contenido de ADN y de digestión de ADN, respectivamente. Los experimentos se repitieron 3 (A) y 2 (B) veces con resultados similares.

Como se comentó en el apartado 2.10, la formación de SCJs depende de Rad51 y Rad52, por lo que decidimos analizar si *asf1Δ* afectaba a la formación de estas estructuras. Para ello, cultivos de células *sgs1Δ* y *sgs1Δ asf1Δ* se sincronizaron en G1 y se liberaron en presencia de MMS 0,033%. Como se observa en la Figura 3.2, *asf1Δ* redujo la formación de SCJs, lo que sugiere que Asf1 contribuye a la formación de estas estructuras a través de su papel en la unión de Rad52 a los daños replicativos.

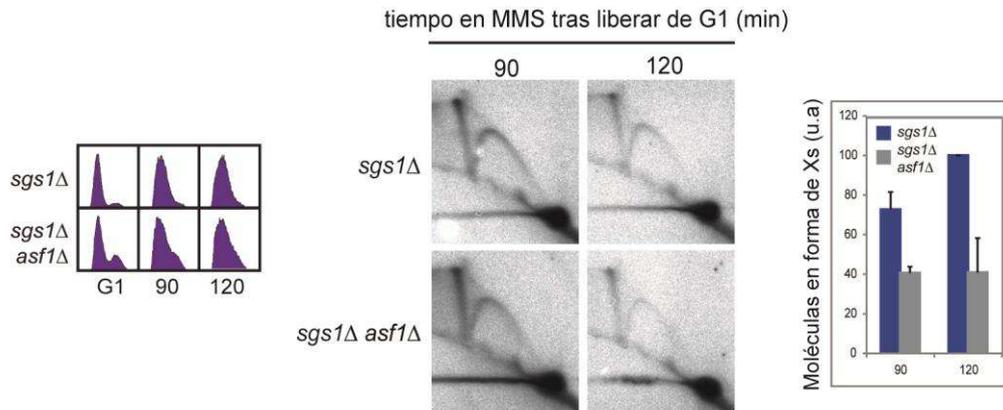


Figura 3.2. Asf1 es necesaria para la formación de SCJs inducidas por MMS. Análisis de estructuras en forma de X mediante geles bidimensionales de cultivos *sgs1Δ* y *sgs1Δ asf1Δ* sincronizados en G1 y liberados en medio fresco en presencia de MMS al 0,033%. La progresión del ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo. Se muestra la media y la SEM de 3 experimentos independientes.

3.2. El papel de Asf1 en la unión de Rad52 al daño replicativo es independiente de su función en la deposición de histonas de nueva síntesis

A continuación nos preguntamos si el papel de Asf1 en la unión de Rad52 en el daño replicativo estaba relacionado con su papel en el ensamblaje de la cromatina de histonas de nueva síntesis. Durante este proceso, la acetilación de H3K56 aumenta la afinidad de H3 por los factores de ensamble CAF1 y Rtt106, los cuales depositan la histona en la horquilla mediante rutas solapantes. Con el objetivo de establecer si esta ruta juega un papel en la unión de Rad52 en el daño replicativo analizamos el mutante *cac1Δ rtt106Δ*. En la Figura 3.3 se muestra el análisis mediante ChEC de cultivos asincrónicos de células silvestres y *cac1Δ rtt106Δ* tratadas o no durante 2 horas con MMS. La ausencia de CAF1 y Rtt106 no afectó a la unión de Rad52 a los daños replicativos. Por el contrario, aumentó el grado de digestión del ADN en ausencia de daño, lo que sugiere que un correcto ensamblaje de la cromatina es necesario para evitar una unión no programada de las proteínas de recombinación a la cromatina replicada en ausencia de estrés replicativo. Por tanto, el papel de Asf1 en la unión de Rad52 a la cromatina dañada es independiente de su función en el ensamblaje de la cromatina, lo cual

es consistente con resultados previos que sugieren que Asf1 promueve la tolerancia a daño replicativo mediante una función que es independiente de su papel en la ruta de ensamblaje mediado por CAF1 y Rtt106 [233].

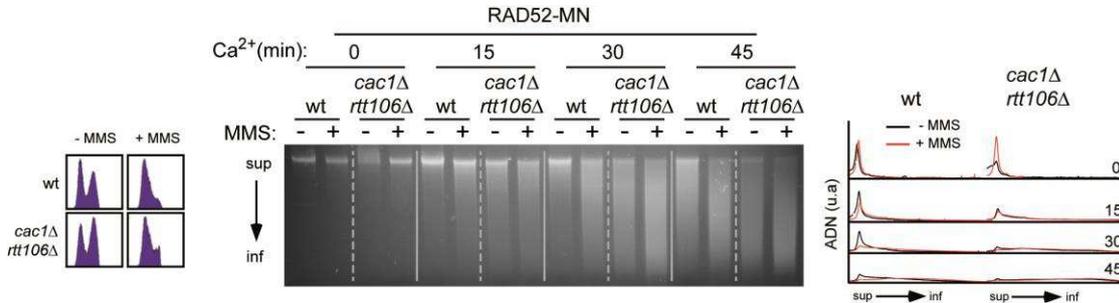


Figura 3.3. CAF1 y Rtt106 afectan a la unión de Rad52 a la cromatina en ausencia de daños. Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina de cultivos asincrónicos de células silvestres y *cac1Δ rtt106Δ* tratados o no durante 2 horas con MMS al 0,05%. Los paneles de izquierda y derecha muestran los perfiles de contenido de ADN y de digestión de ADN, respectivamente. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

3.3 La unión de Rad52 al daño replicativo es independiente de la ruta de DDT mediada por acetilación de H3K56 y Rtt101

Durante la replicación, la histona H3 sintetizada *de novo* es acetilada en la lisina 56 por Asf1 y Rtt109 e incorporada durante fase S. En condiciones normales esta modificación es eliminada en G2. En respuesta a daños durante la replicación esta modificación es mantenida mediante un mecanismo dependiente de checkpoint de fase S que promueve la degradación de las deacetilasas Hst3/Hst4 [85, 238, 239]. La ruta recombinacional en la que participa H3K56ac requiere el reclutamiento a la cromatina del complejo ubiquitina-ligasa Rtt101/Mms1 [237, 240]. Se ha propuesto que en presencia de estrés replicativo, H3K56ac desacopla la helicasa replicativa de las polimerasas replicativas mediante un proceso en el que participa Mrc1 y un factor aún no identificado que sería ubiquitinado por Rtt101 [241, 242]. Por todo ello, decidimos analizar si el defecto en la unión de Rad52 en el daño replicativo en *asf1Δ* era debido a la ausencia de acetilación de H3K56 y/o a defectos en el reclutamiento de Rtt101. El análisis mediante ChEC de cultivos asincrónicos tratados o no con MMS durante 2 horas no mostró diferencias en la unión de Rad52-MN a la cromatina en los mutantes defectivos en acetilación de H3K56 *rtt109Δ* y *H3K56R*, donde la lisina 56 ha sido sustituida por el residuo no acetilable arginina (Figura 3.4A y 3.4B).

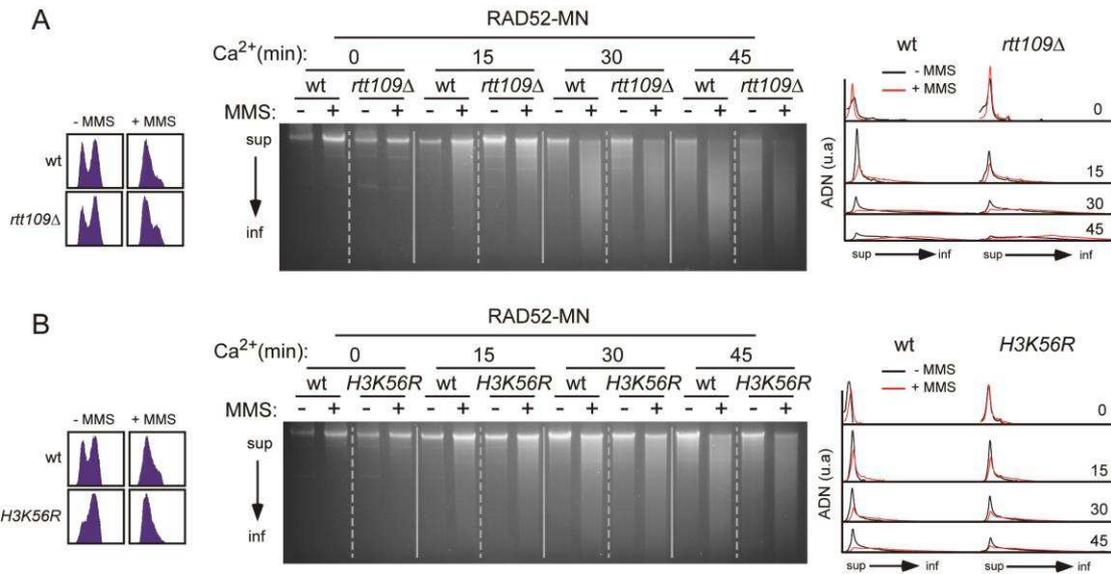


Figura 3.4. La acetilación de H3K56 no regula la unión de Rad52 al daño replicativo. Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina de cultivos asincrónicos de células silvestres, *rtt109*Δ (A) y *H3K56R* (B) tratados o no durante 2 horas con MMS al 0,05%. Los paneles de izquierda y derecha muestran los perfiles de contenido de ADN y de digestión de ADN, respectivamente. Los experimentos se repitieron 2 veces con resultados similares.

De igual manera, *rtt101*Δ tampoco afectó a la unión de Rad52-MN a los daños replicativos (Figura 3.5). En conjunto, estos resultados sugieren que el papel de Asf1 en la unión de Rad52 en el daño replicativo es independiente tanto de la ruta de deposición de histonas de nueva síntesis como de las modificaciones del replisoma mediadas por H3K56ac en respuesta a daño.

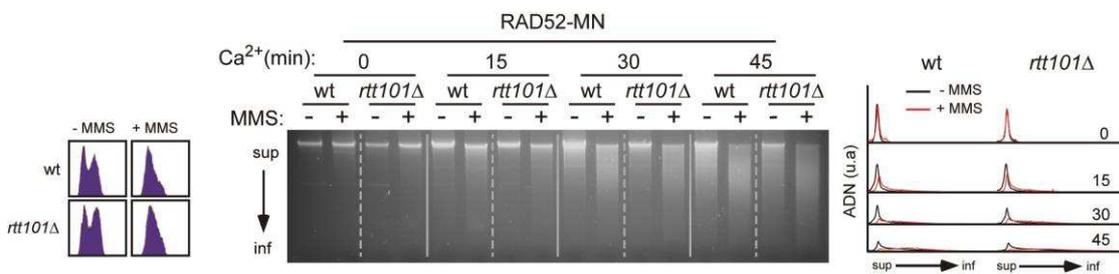


Figura 3.5. La ruta mediada por Rtt101 no es necesaria para la unión de Rad52 al daño replicativo. Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina en cultivos de células silvestres y *rtt101*Δ tratados o no durante 2 horas con MMS al 0,05%. Los paneles de izquierda y derecha muestran los perfiles de contenido de ADN y de digestión de ADN, respectivamente. El experimento se repitió 2 veces con resultados similares.

3.4 Papel del reciclaje de histonas parentales en la unión de Rad52 al daño replicativo

Asf1 interacciona con la helicasa MCM2-7 a través del tetrámero H3/H4 durante la fase S [66, 74], y esta interacción es esencial para el reciclaje de las histonas parentales en las nuevas hebras de ADN [243]. Por ello, decidimos estudiar el papel de la interacción de Asf1 con las histonas en respuesta a estrés replicativo usando el alelo *asf1V94R*, cuya mutación puntual impide la interacción entre Asf1 y H3/H4 [77]. El análisis mediante ChEC de cultivos asincrónicos de células silvestres y mutantes tratados o no con MMS durante 2 horas mostró que la interacción de Asf1 con H3/H4 no es necesaria para la función de Asf1 en la unión de Rad52 en el daño replicativo (Figura 3.6). En conclusión, el defecto de Asf1 en la unión de Rad52 en el daño replicativo es independiente de su interacción con las histonas y por tanto con la helicasa MCM2-7.

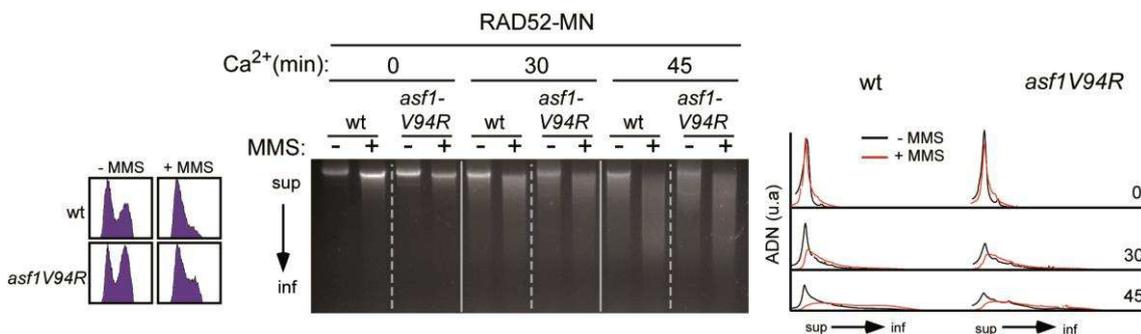


Figura 3.6. La interacción de Asf1 con las histonas no es necesaria para la regulación de la unión de Rad52 al daño replicativo. Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina en cultivos asincrónicos de células silvestres y *asf1V94R* tratados o no durante 2 horas con MMS al 0,05%. Los paneles de izquierda y derecha muestran los perfiles de contenido de ADN y de digestión de ADN, respectivamente. El experimento se repitió 2 veces con resultados similares.

3.5 Rad53 y Asf1 regulan la unión de Rad52 al daño replicativo mediante mecanismos independientes

Asf1 y Rad53 forman un complejo dinámico que se disocia en respuesta a HU pero no a MMS [244, 245]. Rad53 compete con el heterodímero H3/H4 (y con otras chaperonas como HirA/CAF1) por la unión a Asf1, ya que la interacción de Rad53 con Asf1 involucra a los residuos de Asf1 implicados en su interacción con H3/H4. Para determinar si la unión de Rad52 al daño replicativo está regulada por la formación del complejo Asf1/Rad53, decidimos en primer lugar analizar el mutante *sml1Δ rad53Δ*. En la Figura 3.7A se muestra el análisis de unión de Rad52 a daños replicativos de cultivos asincrónicos de *sml1Δ* y *sml1Δ rad53Δ* tratados

o no con MMS al 0,05% durante 2 horas. *sml1Δ rad53Δ* suprimió parcialmente la unión de Rad52 al daño replicativo (Figura 3.7A). Es importante señalar que esta función de Rad53 en la unión de Rad52 al daño replicativo es independiente de su papel en el checkpoint ya que *mec1Δ* no afecta a la unión de Rad52 (Figura 2.12B).

Con objeto de determinar si esta función de Rad53 está mediada esta mediada por el complejo que forma con Asf1, utilizamos el alelo *rad53ALRR*, defectivo en la interacción entre Asf1 y Rad53 [246]. El análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN a la cromatina dañada en este mutante no dio lugar a diferencias respecto a la estirpe silvestre (Figura 3.7B), lo que sugiere que el papel de Rad53 no está mediado por su interacción con Asf1. De acuerdo con este dato, el triple mutante *sml1Δ asf1Δ rad53Δ* suprimió la unión de Rad52 al daño replicativo en mayor medida que los mutantes *asf1Δ* y *sml1Δ rad53Δ* (Figura 3.7C).

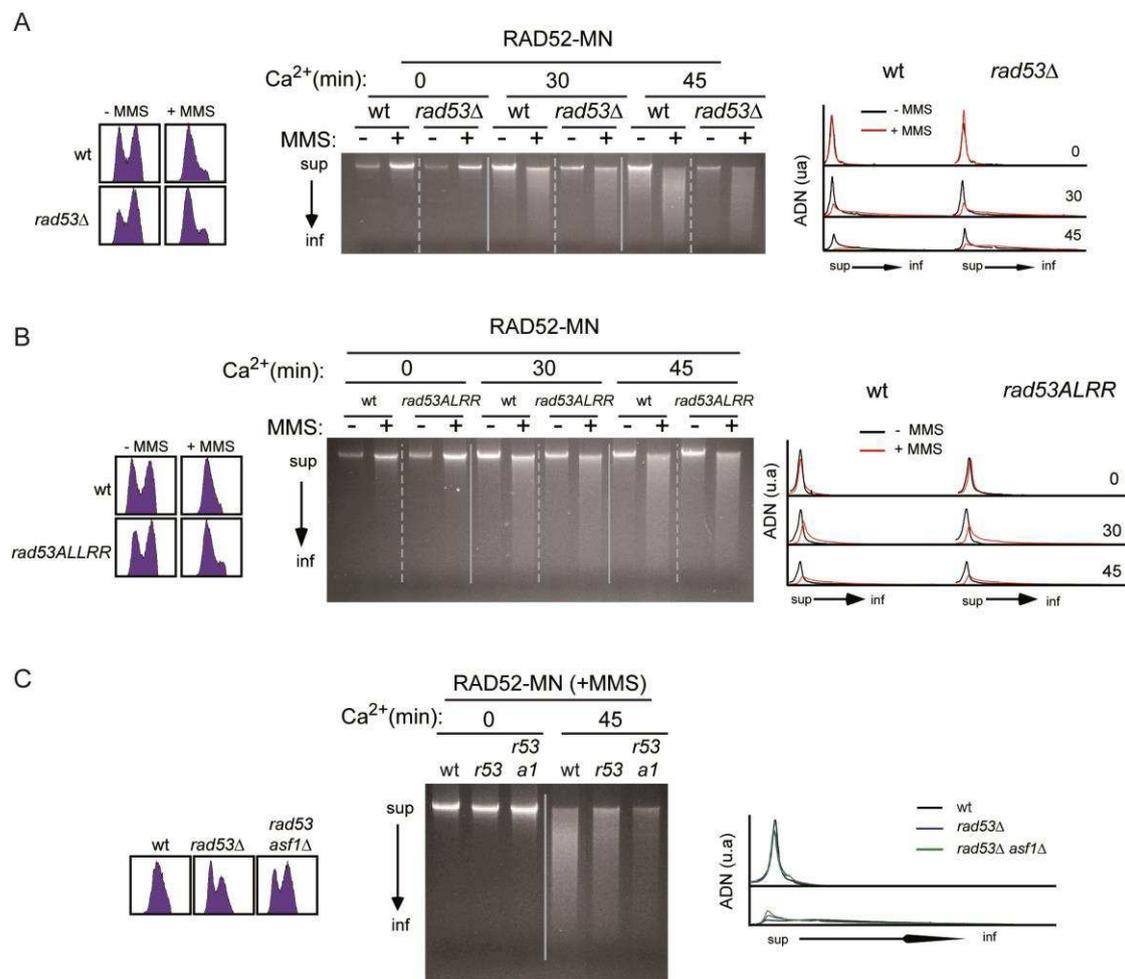


Figura 3.7. Rad53 regula la unión de Rad52 al daño replicativo de manera independiente a Asf1. Análisis mediante ChEC de la unión de Rad52-MN en la cromatina en cultivos asincrónicos de células *sml1Δ*, *sml1Δ rad53Δ* (A), silvestres, *rad53ALRR* (B), *sml1Δ*, *sml1Δ rad53Δ* y *sml1Δ rad53Δ asf1Δ* (C) tratados o no durante 2 horas con MMS al 0,05%. Los paneles de izquierda y derecha muestran los perfiles de contenido de ADN y de digestión de ADN, respectivamente. Los experimentos se repitieron 2 veces con resultados similares.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos demostrado que las proteínas de recombinación Rad51 y Rad52 interactúan físicamente con la helicasa MCM2-7. Además, Rad51, Rad52 y MCM2-7 muestran cinéticas de unión a la cromatina similares durante el ciclo celular: se acumulan en G1, se liberan de la cromatina conforme la fase S progresa, y en presencia de daño se mantienen durante S/G2. La actividad quinasa de Cdc7 es necesaria para la integridad del complejo, y éste, a su vez, para la carga de Rad51, Rad52 y MCM2-7 a las lesiones de ssDNA. En consecuencia, células defectivas en actividad DDK presentan defectos en la reparación recombinacional del daño en el ADN inducido por MMS. Estos resultados señalan a MCM2-7 como una plataforma molecular mediante la cual Cdc7 promueve la unión a las lesiones de ssDNA de las proteínas Rad51 y Rad52 pre-cargadas en la cromatina en G1. Esta estrategia facilitaría la reparación libre de errores como primera opción frente a otras vías mutagénicas. Aunque desconocemos aún el mecanismo mediante el cual MCM2-7/Rad51/Rad52 se une a los daños replicativos, el seguimiento de la unión de Rad52 sugiere que es un proceso regulado tanto por Asf1, mediante una función independiente de su capacidad de unirse a histonas, como por Rad53, mediante una función independiente de su papel en el checkpoint y del complejo que forma con Asf1.

4.1 Rad51 y Rad52 muestran cinéticas de unión a la cromatina similares a las de la helicasa MCM2-7

Hemos demostrado que Rad51 y Rad52, al igual que MCM2-7, se acumulan en la cromatina en G1 y en ausencia de daño son liberados de ésta conforme la replicación avanza. Es probable que la liberación de estos factores esté coordinada gracias a la integridad del complejo MCM2-7/Rad51/Rad52, cuya formación depende de la actividad quinasa de Cdc7 (Figura 2.3). Nuestros datos sugieren que Rad51 y Rad52 se cargan en la cromatina durante el final de mitosis, durante G1, o durante ambas fases al igual que MCM2-7, pero en cualquier caso por una vía independiente a MCM2-7 (Figura 2.5), lo cual es consistente con la ausencia de actividad quinasa de Cdc7 en mitosis tardía/G1.

La inhibición de la actividad quinasa de Cdc7 en fase S tardía/G2 da lugar a una reducción significativa en la fase G1 del siguiente ciclo de los niveles de proteína total y unida a la cromatina tanto de Mcm4 como de Rad51 (Figura 2.6). La degradación de estas proteínas en ausencia de actividad quinasa de Cdc7 sugiere que Cdc7 es necesario 1) para su unión a la cromatina, degradándose si no se unen, ó 2) para su estabilidad si no están unidos a la cromatina. A favor de la primera posibilidad se ha observado que Cdc7 es necesario para la carga de MCM2-7 en células humanas [247]. A favor de la segunda, hemos observado que

MCM2-7 es degradado si no se incorpora a la cromatina en ausencia de actividad Cdc6 (Figura 2.5). En cualquier caso, y dado que en S tardía/G2 tanto MCM2-7 como Rad51 ya se han liberado de la cromatina, este resultado sugiere que Cdc7 es necesario para mantener la estabilidad de Rad51 y de los complejos MCM2-7 que no están unidos a la cromatina.

4.2 La actividad quinasa de Cdc7 promueve la interacción de Rad51 y Rad52 con los complejos helicasa MCM2-7 que no están en la horquilla

Previamente se habían descrito interacciones físicas entre las proteínas de recombinación Rad51 y Rad52 con MCM2-7 tanto en *S. pombe* en respuesta a HU como en células humanas en ausencia y presencia de daños en el ADN [222, 223]. Nosotros hemos demostrado que estas interacciones también existen en *S. cerevisiae*, donde se dan tanto en ausencia de daño como en presencia de estrés replicativo. Además, hemos observado que estas interacciones requieren la actividad quinasa de Cdc7, y que este requerimiento es suprimido por *mcm5-bob1*. Esta mutación causa un cambio conformacional en la helicasa MCM2-7 que rescata la letalidad del mutante *cdc7Δ* al mimetizar el efecto de la fosforilación de MCM2-7 por Cdc7 [31]. El hecho de que la pérdida de la interacción de Rad51 con MCM2-7 por inhibición de Cdc7 la hayamos observado en células que han activado los orígenes de replicación tempranos y progresan a través de la fase S indica que: 1) el requerimiento de Cdc7 no depende de su función en replicación y 2) que la interacción requiere la actividad de Cdc7 de forma continua. Estos resultados sugieren que para que Rad51/Rad52 y MCM2-7 interactúen es necesario un cambio estructural de MCM2-7 que, contrariamente al que se da para su función en la iniciación de la replicación, puede ser revertido en ausencia de actividad quinasa de Cdc7.

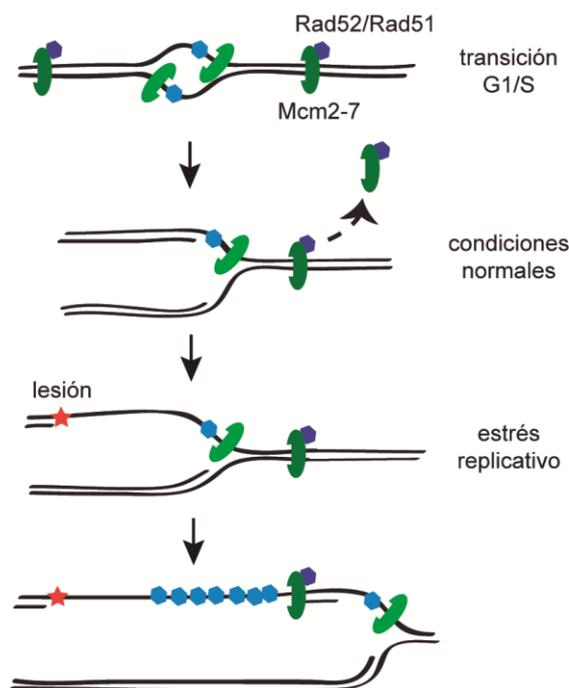
Rad51 y Rad52 viajan con la horquilla [149, 189], y en presencia de aductos en el ADN que impiden su avance promueven el salto de la lesión por mecanismos que aún no han sido esclarecidos [190]. Nuestros análisis de 2D/ChEC sugieren que Rad52 se mantiene unido a la horquilla a pesar de que su interacción con MCM2-7 está disrumpida en *cdc7-4* a temperatura semipermissiva (Figura 2.12). De acuerdo con este dato, este mutante no está afectado en la progresión a través de fase S en presencia de MMS (Figura 2.10), a diferencia de los mutantes *rad52Δ* y *rad51Δ* [188, 189, 214]. Esto sugiere que otros componentes del replisoma deben participar en la unión de Rad52 y Rad51 a la horquilla. De hecho, Rad52 es necesario para la unión de Rad51 a la horquilla [189] pero no a MCM2-7 (Figura 2.1), lo que apunta al nucleofilamento ssDNA/RPA como diana potencial para la carga de Rad52 y Rad51 en la

horquilla, ya que este nucleofilamento es el sustrato natural sobre el que Rad52 carga a Rad51 [248].

4.3 La interacción de Rad51 y Rad52 con el exceso de helicasas MCM2-7 promueve su unión a los daños replicativos

El relleno de los huecos de ssDNA generados por el avance de la lesión de la horquilla está asociado con la formación de centros de reparación de HR. El checkpoint replicativo previene la formación de estos centros durante la fase S, dando lugar a una separación espacio-temporal de las funciones replicativas y reparacionales de Rad51/Rad52. Sin embargo, estas actividades están ligadas mecánicamente como sugiere el hecho de que la restricción de la expresión de Rad52 a G2/M impida la unión de Rad51 a las lesiones de ssDNA, la formación de SCJs y la formación de focos de Rad51 [189], a pesar de que se acumulan huecos de ssDNA en los mutantes *rad51Δ* y *rad52Δ* en presencia de luz UV y MMS [149, 200]. Esto supone una distinción mecánica importante entre la HR inducida por DSBs, donde Rad52 y Rad51 son reclutadas a las lesiones independientemente de replicación y puede, por tanto, ser completada en células que expresan Rad52 solo en G2/M [188, 189, 221]. Nuestros resultados arrojan luz al mecanismo por el que Rad51 y Rad52 son cargadas a las lesiones de ssDNA. Hemos demostrado que Cdc7 promueve la interacción de Rad51 y Rad52 con MCM2-7 independientemente de la presencia o ausencia de daño en el ADN. Debido a que esta asociación no ocurre en la horquilla, debe implicar a los complejos MCM2-7 que son cargados en los orígenes de replicación y distribuidos por la cromatina. Esta población de helicasas está en exceso respecto al número de orígenes de replicación, lo que genera una incógnita sobre su funcionalidad conocida como la paradoja de los MCM2-7. Esta incógnita ha sido parcialmente resuelta al describirse un papel de estos complejos en la activación de orígenes durmientes en condiciones de estrés replicativo [58-60]. Es improbable que un defecto en la activación de orígenes tardíos o durmientes por la inactivación de Cdc7 explique la pérdida de MCM2-7, Rad51 o Rad52 en la cromatina replicada en presencia de MMS, ya que éstos son liberados de la cromatina conforme la replicación avanza, y por tanto, si hubiera algún efecto debería ser el contrario. Además, MCM2-7, Rad51 y Rad52 se mantienen unidos a la cromatina en el mutante *mcm5-bob1* a pesar de la inactivación de la actividad quinasa de Cdc7 (Figura 2.3). Por el contrario, vemos que Cdc7 facilita la unión de Rad51 y Rad52 a los fragmentos de ssDNA que quedan tras la horquilla al promover su interacción con el exceso de helicasas MCM2-7. Debido a que Rad51 no se puede unir a las lesiones postreplicativamente [189], proponemos que MCM2-7, Rad51 y Rad52 pre-cargadas en G1 son reclutadas directamente a las lesiones de

ssDNA conforme las horquillas progresan a través de las lesiones bloqueantes, para posteriormente iniciar la reparación recombinacional (Figura 4.1). Una posibilidad es que la helicasa MCM2-7 funcione como una plataforma molecular que promueva la transferencia de las proteínas de recombinación desde las cromátidas parentales a las nacientes en respuesta a estrés replicativo. Es importante remarcar, no obstante, que los complejos MCM2-7/Rad51/Rad52 están también presentes en ausencia de daños, lo que indica que son necesarios pero no suficientes para el proceso de carga. En conclusión, la incapacidad de las células que expresan Rad52 únicamente en G2/M de rellenar los huecos de ssDNA probablemente refleja la obligación de usar las proteínas de recombinación cargadas en G1.



4.1 Modelo de regulación de la HR durante la DDT. La unión de Rad51/Rad52 a los fragmentos de ssDNA que quedan tras la horquilla requiere la interacción de estas proteínas de HR precargadas en G1 con las helicasas MCM2-7.

4.4 La carga de las proteínas de HR está separada temporalmente de su activación

La actividad CDK separa temporalmente la carga de la helicasa MCM2-7 de su activación para asegurar que los orígenes se activen una única vez por ciclo celular. Así, la baja actividad CDK durante mitosis tardía y G1 permite la acumulación de un exceso de helicasas MCM2-7 como dobles hexámeros inactivos que se distribuyen a lo largo de la cromatina. Durante el resto del ciclo los niveles altos de CDK activan a MCM2-7 a la vez que inhiben la carga de más complejos

helicasa adicionales [16]. Sorprendentemente, Rad52 y Rad51 también se acumulan en G1 a pesar de que la HR está inhibida en esta fase por la falta de actividad CDK [175], y son liberados de la cromatina durante la fase S bajo condiciones normales, lo que sugiere que existen mecanismos que previenen que vuelvan a ser cargados al ADN replicado, a pesar de que en esta fase la actividad CDK promueve la HR. En el caso concreto de la respuesta a MMS CDK no es necesaria para la unión de Rad52/Rad51 a las lesiones de ssDNA pero sí para la formación de SCJs y focos de Rad52 [189]. Por tanto, *S. cerevisiae* segrega la carga de las proteínas de recombinación de su activación. Esta estrategia facilitaría la unión de las proteínas de recombinación a los fragmentos de ssDNA generados durante el avance de la horquilla replicativa, y por tanto su reparación mediante mecanismos de TS libres de errores. En ausencia de daños Rad51 y Rad52 serían liberadas por la propia horquilla replicativa, probablemente utilizando la actividad helicasa de Rrm3 [55]. El objetivo de esta liberación sería probablemente evitar en las regiones replicadas los efectos genotóxicos asociados a los complejos dsDNA/Rad51 [249].

4.5 La fosforilación de S164 y S170 de Mcm2 mediada por Cdc7 regula la unión de Rad52 a las lesiones replicativas en el ADN

La interacción de MCM2-7 con Rad51 y Rad52 promovida por Cdc7 es necesaria para la unión de estos factores de HR a los daños replicativos. El hecho que el mutante *mcm5-bob1* suprime el requerimiento de actividad quinasa de Cdc7 para la formación del complejo (Figura 2.3), sugiere que la fosforilación por Cdc7 de la helicasa MCM2-7 regula la interacción de ésta con las proteínas de HR. De acuerdo con esto, el mutante *mcm2_{AA}*, defectivo en la fosforilación de las serinas 164 y 170 de Mcm2, necesarias para la iniciación de la replicación y viable en presencia de la mutación *mcm5-bob1*, regula la unión de Rad52 al daño replicativo (Figura 2.16). Además, el mutante fosfomimético *mcm2_{EE}* suprime el defecto de *cdc7-4* en la unión de Rad52 a los fragmentos de ssDNA (Figura 2.16). Dado que la integridad del complejo es necesaria para la unión de éste al daño replicativo, este dato sugiere que la fosforilación de S164 y S170 de Mcm2 es necesaria para su integridad. Sin embargo, *mcm2_{AA}* no afecta a la unión de Mcm4 con Rad51 (dato no mostrado), aunque no podemos descartar que, al igual que *cdc7-4*, sólo esté afectando la unión de Mcm4 con Rad52, lo que sería consistente con la idea de que la interacción de MCM2-7 con Rad51 y Rad52 esté regulada por diferentes sitios de fosforilación dentro de la helicasa. De hecho, y consistente con la posibilidad de que la respuesta recombinacional a MMS este regulada por la fosforilación de varios residuos dentro

de MCM2-7 por Cdc7, el mutante *mcm2_{AA}* a diferencia de *cdc7-4* no presenta defectos en la formación de SCJs (Figura 2.19) o en la reparación recombinacional de los daños replicativos (Figura 2.22).

4.6 Cdc7 es necesario para la reparación recombinacional durante DDT

La necesidad de la formación de un complejo MCM2-7/Rad51/Rad52 dependiente de Cdc7 para la unión a la cromatina dañada de las proteínas de HR sugiere un papel de esta quinasa en la ruta recombinacional de DDT. Análisis genéticos previos de sensibilidad a MMS y luz UV colocaron a *CDC7* y *RAD5* en grupos epistáticos distintos [250]. Dado que Rad51 y Rad52 cooperan con Rad6 y Rad5 en TS [212, 251], esos análisis sugerían que Cdc7 no está en la ruta de HR. De hecho, Cdc7 es necesario para TLS [199]. Sin embargo, estos estudios de sensibilidad a MMS también han demostrado que en respuesta a MMS, *CDC7* opera en una ruta diferente a *RAD30* y *REV3*, los cuales codifican las polimerasas de TLS Pol η y Pol ζ , respectivamente [250]. Además, *cdc7 Δ* exacerba la sensibilidad a luz UV de un mutante de PCNA defectivo en ubiquitinación y sumoilación (*pol30-K127R,K164R*) [252], el cual, como hemos comentado en la introducción, es defectivo en TLS y TS dependiente de Rad5 pero responde al daño replicativo activando una ruta de HR independiente de ubiquitinación de PCNA. Por tanto, el defecto sinérgico en sensibilidad a daños replicativos del mutante *cdc7 Δ pol30-K127R,K164R* sugiere un papel de DDK en HR. Nuestros datos moleculares y celulares demuestran que Cdc7 es necesario para la formación de SCJs inducidas por MMS (Figura 2.18), cuya formación depende de Rad51 y Rad52 [210], así como para la reparación recombinacional de las lesiones replicativas de ssDNA (Figura 2.21). De hecho, la inactivación de Cdc7 una vez finalizada la replicación también genera defectos en la reparación recombinacional de las lesiones replicativas (Figura 2.21), lo que sugiere que Cdc7 tiene además un papel postreplicativo durante la reparación de estos daños. Estos defectos, sin embargo, no son suficientes para evitar que se complete la recombinación (Figura 2.23). Dado que la unión de Rad52 no es necesaria para que las lesiones de ssDNA/RPA se dirijan a los centros de reparación [189], por tanto, es posible que la carga de Rad52 en una proporción de las lesiones sea suficiente para nuclear las proteínas Rad52 y Rad51 necesarias para completar la reparación.

4.7 Asf1 y Rad53 regulan la unión de Rad52 en el daño replicativo

Nuestros datos sugieren que las helicasas MCM2-7 operan como plataformas moleculares implicadas en la transferencia de los factores de recombinación de las cromátidas parentales a las nacientes en respuesta a estrés replicativo. Recientemente se ha demostrado que el dominio chaperona de Mcm2 facilita el reciclaje de las histonas parentales en la horquilla [76] y de acuerdo con esta función se han resuelto complejos Mcm2/H3/H4 2:2:2 y Mcm2/H3/H4 1:2:2 [67]. Estos complejos coexisten con complejos 1:1:1:1 Mcm2/H3/H4/Asf1 [67], lo que implica también a la chaperona Asf1 en el proceso de reciclaje de histonas parentales. Dado que MCM2-7 regula la unión de Rad52 al daño replicativo y Rad51 y Rad52 interaccionan con las histonas H3 y H4 [253] proponemos un modelo especulativo (Figura 4.2) en el que los complejos MCM2-7/Rad51/Rad52 se transfieran desde las cromátidas parentales a las nacientes mediante el reciclaje de histonas parentales. De acuerdo con este modelo, nuestros datos muestran que Asf1 es necesario para la unión de Rad52 a las lesiones replicativas y para la formación de SCJs (Figura 3.1 y Figura 3.2). Sin embargo, estas funciones son independientes de su capacidad de unión a histonas (Figura 3.6), y en consecuencia, también de su papel en la acetilación de H3K56 (Figura 3.4). De hecho, defectos en el ensamblaje de histonas en el mutante *cac1Δ rtt106Δ* no afectan a la unión de Rad52 en presencia de MMS, aunque la mayor unión en ausencia de daño (Figura 3.3) sugiere que el ensamblaje de la cromatina y/o la integridad de esta juegan un papel en la dinámica de unión de Rad52.

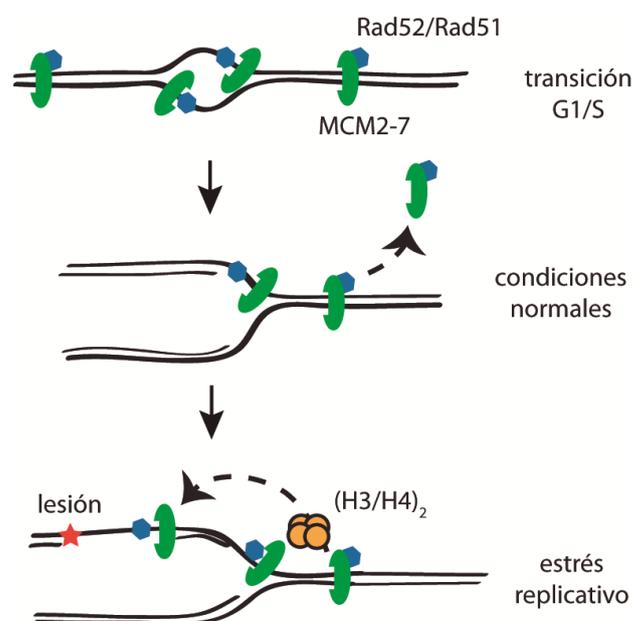


Figura 4.2. Modelo especulativo de regulación de la HR durante la DDT. Los complejos MCM2-7/Rad51/Rad52 serían transferidos desde las cromátidas parentales a las nacientes mediante el reciclaje de histonas parentales.

El papel de Asf1 en la unión de Rad52 tampoco parece estar asociado a su interacción con Rad53, la cual es independiente de histonas. Curiosamente, Rad53 también regula la unión de Rad52 al daño replicativo, pero por una vía independiente a su interacción con Asf1 (Figura 3.7). Rad53 está implicado en la degradación del exceso de histonas solubles mediante su asociación con ellas en un complejo dinámico que es regulado por su actividad quinasa e independiente de su función en checkpoint [254]. Dado que las histonas solubles compiten con la maquinaria de HR en la unión al ADN e incluso son capaces de unirse a Rad51 y Rad52 interfiriendo con la reparación [253], Rad53 podría estar regulando la unión de Rad52 a los daños replicativos a través de la regulación de los niveles de histonas. En conjunto, estos datos apuntan a un papel aún por definir de la cromatina en la unión de los complejos MCM2-7/Rad51/Rad52 durante la DDT.

5. CONCLUSIONES

1. Rad51 y Rad52 interactúan con las helicasas MCM2-7 que no se encuentran en la horquilla, tanto en ausencia como en presencia de daños en el ADN. La interacción de Rad51 con MCM2-7 es independiente de Rad52.
2. La actividad quinasa de Cdc7 es necesaria para la interacción de Mcm4 con Rad51 y Rad52, siendo este requerimiento suprimido por la mutación *mcm5-bob1*.
3. MCM2-7, Rad51 y Rad52 presentan cinéticas similares de unión a la cromatina durante el ciclo celular: se acumulan en G1, se liberan de la cromatina conforme la fase S progresa, y en presencia de daños inducidos por MMS se mantienen durante S/G2.
4. La acumulación de Rad51 en la cromatina en G1 es independiente de la carga de MCM2-7, consistente con la ausencia de actividad quinasa de Cdc7 en G1 y la necesidad de ésta para la interacción.
5. La actividad quinasa de Cdc7 es necesaria para mantener los niveles de proteína de MCM2-7 y Rad51 que no están unidos a la cromatina.
6. Las interacciones entre MCM2-7, Rad51 y Rad52 son necesarias para su unión en la cromatina replicada en presencia de daño replicativo.
7. La fosforilación de las serinas 164 y 170 de Mcm2 mediada por Cdc7 es necesaria para la unión de Rad52 a las lesiones replicativas en el ADN.
8. La actividad quinasa de Cdc7 es necesaria para la correcta reparación recombinacional de los daños inducidos por MMS. En concreto, una reducción de actividad Cdc7 causa defectos en la formación de uniones entre cromátidas hermanas y en el relleno por recombinación homóloga de las lesiones de ssDNA generadas durante la replicación de ADN alquilado.
9. Asf1, mediante una función independiente de su capacidad de unirse a las histonas, y Rad53, mediante una función independiente de su papel en checkpoint y de su interacción con Asf1, regulan la unión de Rad52 al daño replicativo inducido por MMS.
10. En conjunto, estos datos señalan a MCM2-7 como una plataforma molecular mediante la cual Cdc7 promueve la unión de moléculas de Rad51 y Rad52 precargadas en G1 a las lesiones de ssDNA generadas durante la replicación del ADN alquilado. Esta estrategia favorecería la reparación libre de errores sobre la mutagénica. En este proceso de unión a las lesiones de ssDNA participan, mediante mecanismos que aún desconocemos, los factores Asf1 y Rad53.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estirpes

Las estirpes de levadura utilizadas en esta tesis se muestran en la Tabla 5.1. La mayoría de las estirpes se obtuvieron mediante cruces genéticos. Para ello, las estirpes parentales haploides se cruzaron en medio rico YPAD y los diploides generados se seleccionaron en medios selectivos o se micromanipularon. Posteriormente, los diploides se sembraron en medio de esporulación para inducir la meiosis y las ascas se diseccionaron en un micromanipulador SINGER MK1 (Singer LTD) tras un tratamiento con zimoliasa a 2mg/ml durante 1 minuto. El genotipo se determinó mediante réplicas en placas con diferentes medios selectivos, y el sexo analizando la capacidad de las esporas para formar diploides con las cepas F4 (a) y F15 (α).

| ESTIRPE | GENOTIPO | REFERENCIA | FIGURAS |
|---------------------------|--|------------|---|
| wcdc7asMCM4GFP-4 | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100 his3-11,15 cdc7as3MYC MCM4GFP::URA bar1Δ::HisG can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.1A-B; 2.2; 2.4A; 2.5A-C; 2.7A-B; 2.8A-B; 2.12 |
| wcdc7asrad52ΔMCM4GFP-3A | <i>MATa trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 cdc7as3MYC rad52Δ::HYGMX4 bar1Δ::HisG MCM4GFP::URA3 RAD5</i> | Esta tesis | 2.1A |
| wcdc7as3_2 | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7as3MYC bar1Δ::HisG can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.1A-B; 2.2; 2.3B; 2.12; 2.21A-C |
| wp4M4GFP-29C | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7as3MYC MCM4GFP::URA pep4Δ::ADE2 bar1Δ::HisG can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.3A |
| wcdc7asb1p4M4GFP-15C | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7as3MYC MCM4GFP::URA mcm5/bob1 pep4Δ::ADE2 bar1Δ::HisG can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.3A; 2.8E-F |
| wp4-14D | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7as3MYC pep4Δ::ADE2 bar1Δ::HisG can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.3A |
| wbob1MCM4GFP-4b | <i>MATa trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 cdc7as3MYC mcm5/bob1 MCM4GFP::URA3</i> | Esta tesis | 2.3A; |
| wbob1cdc7ΔMCM4GFP-1b | <i>MATa trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 mcm5/bob1 cdc7Δ::HIS3 bar1Δ::HisG MCM4GFP::URA3 RAD5</i> | Esta tesis | 2.3A |
| wRad52eGFP_1 | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 Rad52-eGFP::URA3 can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | |
| wcdc7asMCM4HAR52GFP-2A | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 Rad52-GFP cdc7as MCH4HA::HIS3 bar1Δ::HisG can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.4C-D; 2.7C-D; 2.8C-D |
| wGALCDC6MCM4GFPcdc7as-11B | <i>MATa trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 cdc7as3::MYC CDC6::TRP1::Galp-CDC6 bar1Δ::HisG RAD5</i> | Esta tesis | 2.5A-C |
| w303R52MN-14B | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 Rad52MN::HIS3 bar1Δ::HisG can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.9A-B; 2.10E; 2.13B; 2.17B |

| | | | |
|--------------------|---|------------|---------------------------------------|
| wR52MNCdc7-4-2A | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 Rad52MN::HIS3 cdc7-4 bar1Δ::HisG can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.9A-B; 2.10E; 2.13B; 2.17B |
| w303-1aR5 | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5</i> | [189] | 2.10A-C; 2.10F; 2.11A; 2.20C; 2.23A-B |
| wcdc7-4-2b | <i>MATa leu2-3,112 TRP1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7-4 can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.10A-C; 2.10F; 2.11A; 2.20C; 2.23A-B |
| w303CAN-1B | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 RAD5</i> | Esta tesis | 2.11B |
| wcdc7-4CAN-8c | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7-4 RAD5</i> | Esta tesis | 2.11B |
| wcdc7-4MCM4GFP-2B | <i>MATa leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7-4 MCM4GFP::URA3 can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.12 |
| BYmsb-11c | <i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 RAD52MN::HIS3 mec1Δ::NATMX4 sml1Δ::HYGMX4 bar1Δ::HYGMX4</i> | [189] | 2.14 |
| BYr52MNsml1-6A | <i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 Rad52MN::HIS3 sml1Δ::HYGMX4 bar1Δ::HYGMX4</i> | [189] | 2.14 |
| BYR52MNR5revs-2B | <i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 RAD52MN::HIS3 rad5Δ::HYGMX4 rad30Δ::KANMX4 rev3Δ::HisG rev1Δ::HisG</i> | [189] | 2.14 |
| BYbRad52MN-6A | <i>MATa his3Δ1 ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 RAD52MN::HIS3 bar1Δ::HYGMX4</i> | [189] | 2.14; 3.1A-B; 3.3; 3.4A; 3.5; 3.6 |
| wR52GFP-4c | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 RAD52-GFP can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.20A |
| PP544 | <i>MATa leu2-3,112 TRP1 ura3-1 ade2-1 GPO-TK::URA3 Rad52-GFP cdc7-4 RAD5</i> | [188] | 2.20A |
| wcdc7-4w3775-2c | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7-4 RFA1-8ala_YFP RAD5</i> | Esta tesis | 2.20B |
| w3775-3c | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 RFA1-8ala_YFP can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.20B |
| BY167 | <i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys5Δ0 MCM2::URA3</i> | [29] | 2.15 |
| BY169 | <i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys5Δ0 mcm2aa::URA3</i> | [29] | 2.15 |
| BY167R52MN-2 | <i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys5Δ0 MCM2::URA3 Rad52MN::HIS3</i> | Esta tesis | 2.16A |
| BY169R52MN-4 | <i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys5Δ0 mcm2aa::URA3 RAD52-MN::HIS3</i> | Esta tesis | 2.16A |
| BY191R52MN-4 | <i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys5Δ0 mcm2ee::URA3 RAD52-MN::HIS3</i> | Esta tesis | 2.16A |
| BY167cdc7-4R52MN | <i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys5Δ0 Rad52MN::HIS3 MCM2::KANMX4 cdc7(1-391)::URA3::cdc7-4</i> | Esta tesis | 2.16B |
| BY191cdc7-4R52MN-7 | <i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys5Δ0 RAD52MN::HIS3 mcm2ee::KANMX4 cdc7(1-391)::URA3::cdc7-4</i> | Esta tesis | 2.16B |
| w303sgs1 | <i>MATa trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 sgs1Δ::KANMX4 RAD5</i> | [189] | 2.18 |
| wcdc7-4sgs1-1D | <i>MATa trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 sgs1Δ::KANMX4 cdc7-4 RAD5</i> | Esta tesis | 2.18 |
| BY167sgs1-3A | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys5Δ0</i> | Esta tesis | 2.19 |

| | | | |
|---------------------------|---|------------|------------|
| | <i>sgs1Δ::KANMX4 MCM2::URA3 bar1Δ::HYGMX4</i> | | |
| BY169sgs1-5B | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys5Δ0 sgs1Δ::KANMX4 mcm2_{AA}::URA3 bar1Δ::HYGMX4</i> | Esta tesis | 2.19 |
| w167-3D | <i>MATa leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 lys5Δ0 MCM2::URA3 MCM4GFP::URA3 can1-100 RAD5</i> | Esta tesis | 2.22 |
| w169-5D | <i>MATa leu2-3,112 ura3-1 mcm2aa::URA3 MCM4GFP::URA3 RAD5</i> | Esta tesis | 2.22 |
| BYbasf1R52MN-1B | <i>MATa his3Δ1 ura3Δ0 leu2Δ0 asf1Δ::KANMX4 RAD52-MN::HIS3 bar1Δ::HYGMX4</i> | Esta tesis | 3.1A-B |
| BYsgs1Δb | <i>MATa his3Δ1 ura3Δ0 leu2Δ0 sgs1Δ::KANMX4 bar1Δ::HYGMX4</i> | [189] | 3.2 |
| BYasf1sg1-7c | <i>MATa his3Δ1 ura3Δ0 leu2Δ0 sgs1Δ::KANMX4 asf1Δ::KANMX4 bar1Δ::HYGMX4</i> | Esta tesis | 3.2 |
| BYbcac1rtt106R52 MN-8A | <i>MATa his3Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0 cac1Δ::KANMX4 rtt106Δ::KANMX4 RAD52-MN::HIS3 bar1Δ::HYGMX4</i> | Esta tesis | 3.3 |
| BYrtt101R52MN- 1C | <i>MATa his3Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0 rtt101Δ::KANMX4 RAD52-MN::HIS3 bar1Δ::HYGMX4</i> | Esta tesis | 3.5 |
| BYrtt109R52MN- 7A | <i>MATa his3Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 rtt109Δ::KANMX4 RAD52-MN::HIS3 bar1Δ::HYGMX4</i> | Esta tesis | 3.4A |
| BYasf1V94RR5MN- 12C | <i>MATa his3Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 RAD52- MN::HIS3 asf1^{V94R}₁₃MYC::HIS3</i> | Esta tesis | 3.6 |
| BYs1R52MN-11C | <i>MATa his3Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 RAD52- MN::HIS3 sml1Δ::HYGMX4</i> | Esta tesis | 3.7A; 3.7C |
| BYr53s1R52MN-8B | <i>MATa his3Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 RAD52- MN::HIS3 sml1Δ::HYGMX4 rad53Δ::NATMX4</i> | Esta tesis | 3.7A; 3.7C |
| BYasf1r53s1R52M N-1B | <i>MATa his3Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 Rad52MN::HIS sml1Δ::HYGMX4 asf1Δ::KANMX4 rad53Δ::NATMX4</i> | Esta tesis | 3.7C |
| MSY421R52MNH3 wt-2 | <i>MATa hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ leu2Δ0 ura3Δ0 trp1Δ0 his3Δ0 RAD52-MN::HIS3 + (hht1-hhf1, CEN URA)</i> | Esta tesis | 3.4B |
| MSY421R52MNH3 K56R-2 | <i>MATa hht1-hhf1Δ hht2-hhf2Δ leu2Δ0 ura3Δ0 trp1Δ0 his3Δ0 RAD52MN::HIS3 + (H3K56R, CEN TRP1)</i> | Esta tesis | 3.4B |
| wCMY156352MN- 5A | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100 his3-11,15 RAD53::URA3::rad53Δ::HIS3 RAD52- MN::HIS RAD5</i> | Esta tesis | 3.7B |
| wALRRR52MN-13B | <i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100 his3-11,15 rad53ALRR::URA3::rad53Δ::HIS3 RAD52-MN::HIS3 RAD5</i> | Esta tesis | 3.7B |

Tabla 6.1 Estirpes de levadura

Para etiquetar proteínas, generar quimeras, o reemplazar genes se siguió el protocolo descrito en [255]. Los fragmentos de ADN se amplificaron por PCR utilizando oligos con homología a la región a amplificar y al gen a reemplazar o etiquetar (Figura 6.1). La estirpe original se transformó con el ADN lineal resultante y se seleccionó el fenotipo deseado. Los

candidateos se comprobaron por Southern blot y/o PCR usando oligos externos a la zona etiquetada o reemplazada (oligos en la Tabla 6.4).

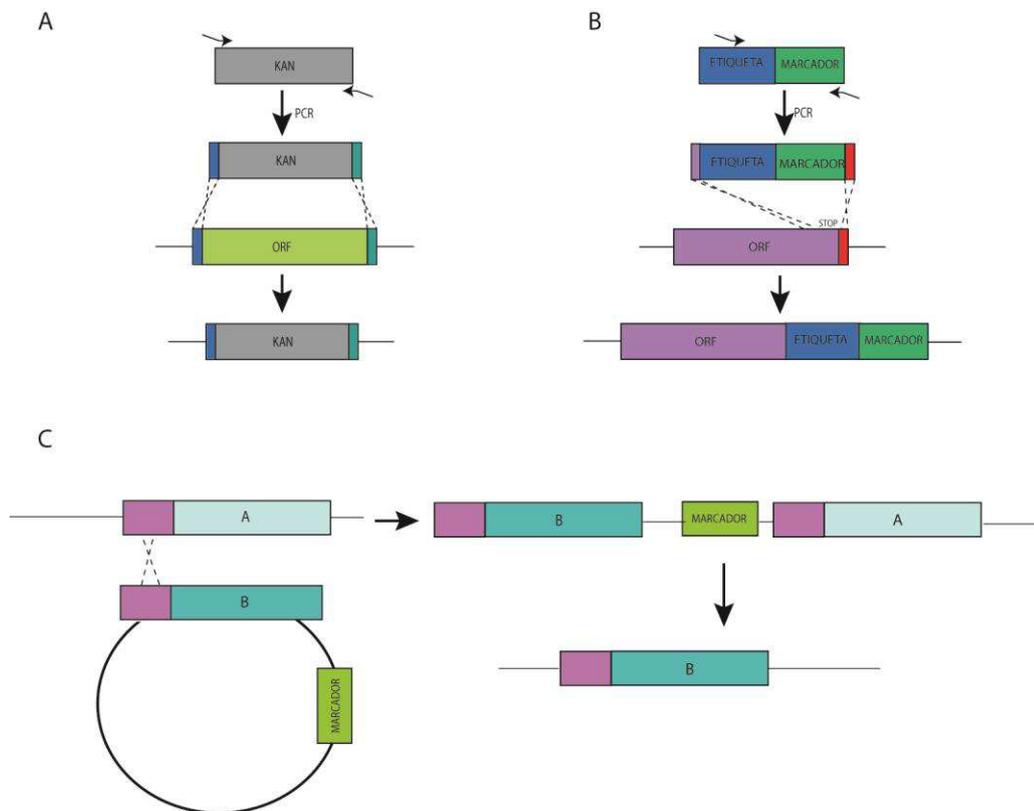


Figura 6.1. Representación esquemática de los procesos de construcción de estirpes basados en recombinación homóloga. (A) Delección de un gen. (B) Etiquetado de una proteína. (C) Integración de una mutación.

El plásmido pRS551-L120A,V181A (N. Hollingsworth, no publicado) se usó para reemplazar *CDC7* por *cdc7as3* en *wcdc7as3-2*. Para ello la estirpe silvestre se transformó con pRS551-L120A,V181A cortado con *EcoRI*, se creció en medio sin uracilo para seleccionar la integración y posteriormente en medio con ácido 5-fluoroacético para seleccionar las células que habían perdido una de las dos copias (Figura 6.1C). Los candidateos se confirmaron por Southern blot y secuenciación de ADN. Una estrategia similar se usó para generar la estirpe *CAN1* en *w303-1AR* usando el plásmido pRS306CAN1 cortado parcialmente con *HindIII*. Las estirpes BY167cdc7-4R52MN y BY191cdc7-4R52MN se construyeron mediante la integración del vector pRS306cdc7-4 cortado parcialmente con *NsiI* en BY167R52MN y BY191R52MN y posterior selección de los candidateos termosensibles. Las quimeras Rad52-MN y Mcm4-EGFP en las estirpes MSY421 y *wcdc7as3-2* se construyeron clonando en los extremos carboxiterminal de *RAD52* y *MCM4* de las estirpes MSY421R52MNH3wt-2,

MSY421R52MNH3K56R-2 y *wcdc7asMCM4GFP-2* las etiquetas MN y EGFP, respectivamente [232](Figura 6.1B).

6.2 Plásmidos

Para la obtención y propagación de plásmidos se utilizó la estirpe de *E.coli* DH5 α : *f- endA1 gyr96 hsdR17 Δ lacU16 9 (f80lacZ Δ M15) recA1 relA1 supE44 thi-1* [256]. Los plásmidos utilizados en esta tesis se muestran en la Tabla 5.2.

| PLÁSMIDO | Marcadores más relevantes | Referencia |
|--------------------|---|----------------------------------|
| pWJ1344 | <i>CEN, LEU, RAD52::YFP::CYCt</i> | R.Rothstein, Columbia University |
| pFA6a-MN-HIS3MX6 | vector de marcaje con MN con el marcador <i>HIS3</i> | [232] |
| pKT209 | vector de marcaje con EGFP con marcador caURA3 | [257] |
| pRS306-SU | <i>CEN, URA3, leu2Δ3'::leu2Δ5'</i> | [258] |
| pFA6KanMX4 | vector de expresión del marcador de resistencia a kanamicina | [259] |
| pAG32 | vector de expresión del marcador de resistencia a hygromicina | [260] |
| pAG25 | vector de expresión del marcador de resistencia a nourseotricina | [260] |
| pRS551-L120A,V181A | vector integrativo que contiene <i>cdc7-L120A,V181A-myc9</i> con marcador <i>URA3</i> | N. Hollingsworth |
| pRS416CDC7 | vector centromérico de expresión de <i>CDC7</i> con marcador <i>URA3</i> | Esta tesis |
| pRS306CAN1 | vector integrativo que contiene el gen <i>CAN1</i> con marcador <i>URA3</i> | Esta tesis |
| pRS306cdc7-4 | vector integrativo que contiene un fragmento de <i>cdc7-4</i> | Esta tesis |

Tabla 6.2. Plásmidos

El plásmido pRS416CDC7 se construyó insertando en las dianas *NotI-XhoI* de pRS416 un fragmento de PCR que contiene el gen *CDC7*. El plásmido pRS306CAN1 se construyó insertando en las dianas *XhoI-XbaI* de pRS306 un fragmento de PCR de 1773 pb *CAN1* que contiene la región silvestre a la mutación *can1-100*. El plásmido pRS306cdc7-4 se construyó insertando en las dianas *XhoI-XbaI* de pRS306 un fragmento de PCR de 1775 pb de *CDC7* que contiene la mutación *cdc7-4*, la cual se confirmó por secuenciación.

5.3 Medios y condiciones de crecimiento

Las estirpes de levaduras se incubaron a 30°C (excepto en los casos especificados que se crecieron a 26°C) tanto en placa como en cultivo líquido con agitación horizontal constante. Los medios de cultivo rico (YPAD y YPAG), mínimo sintético (SDc), mínimo complementado (SMM) especificando los aminoácidos o bases omitidas (p. ej. SMM-leucina) y de esporulación (SPO) se prepararon de acuerdo a [261] (ver Apéndice).

Las estirpes de bacteria se incubaron a 37°C en medio rico (LB).

6.4 Transformación de células

6.4.1 Transformación de bacterias

Se mezclaron 100 µl de células competentes de *E.coli* DH5 α preparadas según [262] con 50-100 ng de ADN y se incubaron en hielo durante 30 min. A continuación las células se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 1 min seguido de 2 min en hielo. Posteriormente se añadió a las células 1 ml de LB y se incubaron durante 45 min a 37°C. Finalmente, las células se recogieron por centrifugación y se sembraron en LB+Ampicilina.

6.4.2 Transformación de levaduras

Las estirpes de levadura se transformaron siguiendo el método descrito en [261] a partir de 5 ml de cultivo en fase exponencial. Las células se lavaron con acetato de litio (AcLi) 100 mM, se recogieron por centrifugación y se mezclaron con PEG4000 al 50%, AcLi 100 mM, ADN desnaturalizado de esperma de salmón a 2mg/ml y 0,1-10 µg de ADN. Tras incubarlas a 30°C durante 30 min, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 20 min. Posteriormente, se lavaron y sembraron en el medio selectivo pertinente, salvo en aquellos casos en los que se transformaron con marcadores de resistencia a drogas, en cuyo caso se incubaron en YPAD 2 horas antes de ser lavadas y sembradas.

6.5 Sincronización de cultivos de levaduras

Las células se sincronizaron en G1 con factor α a partir de cultivos de SMM en fase exponencial ($D.O_{660} = 0,3-0,5$), a los que se les añadió factor α dos veces en intervalos de 60 min a 2 µg/ml en el caso de estirpes *BAR1* y 0,25 µg/ml en el caso de las estirpes *bar1* Δ . Para liberar las células del bloqueo de G1, éstas se lavaron 3 veces y se resuspendieron en medio fresco con pronasa a 50 µg/ml en presencia o ausencia de agentes genotóxicos.

6.6 Análisis de viabilidad y sensibilidad a daños en el ADN

La viabilidad y sensibilidad a agentes genotóxicos de las estirpes de levadura se determinó mediante ensayos de gotas con diluciones seriadas (factor de dilución de 10) a partir del mismo número de células de cultivos en fase exponencial. Para ello, el número de células se determinó mediante contaje con una cámara Burker. A continuación, se sembraron 5 μ l de cada concentración en placas de SMM con y sin los correspondientes agentes genotóxicos, a las concentraciones indicadas.

6.7 Extracción de ADN genómico de levaduras

6.7.1 Extracción estándar para Southern blot, PCR y ChEC

La extracción de ADN plasmídico de *E.coli* se realizó siguiendo el método descrito en [263] a partir de cultivos crecidos en LB+Ampicilina.

El ADN para el análisis mediante ChEC se extrajo siguiendo el protocolo de Miniprep de ADN de levadura descrito en [261] con las siguientes modificaciones. Las células tratadas mediante ChEC de un cultivo de 50 ml se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 320 μ l de sorbitol 0,9M, EDTA 0,1M, 0,1% β -mercaptoetanol y se incubaron 1 hora a 37°C con 10 μ l de zimoliasa 20T a 15 mg/ml. Los esferoplastos se recogieron y resuspendieron en 370 μ l de Tris 50 mM, EDTA 20mM pH 8 y se incubaron con 16 μ l de SDS 10% durante 30 minutos a 65°C. A continuación, se precipitaron las membranas añadiendo 85 μ l de acetato sódico 5M e incubando en hielo durante 1h. Posteriormente, se centrifugó y el sobrenadante se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol 96%. El ADN precipitado se resuspendió en 300 μ l de TE y se incubó 30 min a 37°C con 2 μ l de RNasa A 10 mg/ml. Tras la incubación, el sobrenadante se mezcló con 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1 y se pasó la fase superior a un nuevo tubo. Se volvió a precipitar con etanol 96%, se lavó con etanol 70% y el ADN se resuspendió en 100 μ l de TE 1X. Este protocolo se utilizó también para el análisis de ADN por Southern blot y PCR.

6.7.2 Extracción para análisis de intermediarios replicativos por ChEC/2D

Para el análisis de intermediarios replicativos de células tratadas por ChEC el ADN se extrajo mediante el protocolo de columnas de intercambio iónico [189]. Las células tratadas mediante ChEC de un cultivo de 300 ml se lavaron primero con 5 ml de agua bidestilada y posteriormente con 5 ml de TE 1X. Posteriormente las células se resuspendieron en 4 ml de

tampón Y1 (1 M sorbitol, 100 mM EDTA pH 8, 14 mM β -mercaptoetanol) y se incubaron con 250 μ l de zimoliasa a 50 mg/ml durante 1 h a 30°C. Posteriormente se centrifugaron 10 min a 5000 g a 4°C, y el precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón G2 (800 mM guanidina HCl; 30 mM TrisCl, pH 8,0; 30 mM EDTA, pH 8,0; 5% Tween-20; 0,5% Triton X-100) y se incubó con 100 μ l de proteinasa K a 0,3 mg/ml a 50°C durante 35 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 10 min a 5000 g y 4°C y los sobrenadantes se pasaron a tubos nuevos donde se les añadió 5 ml de tampón QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% isopropanol, 0,15% Triton X-100) antes de pasarlas mediante flujo gravitacional a través de columnas de intercambio aniónico (QIAGEN Genomic Tip 100/G) previamente equilibradas con 4 ml de tampón QBT. Las columnas se lavaron con 7,5 ml de tampón QC_{0,8} (800 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% isopropanol) dos veces y se eluyeron con 5 ml de tampón QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 8,5, 15% isopropanol) previamente atemperado a 50°C. A cada muestra se le añadió 3,5 ml de isopropanol, se mezcló con suavidad y se centrifugó a 8000 g 25 min a 4°C. El ADN precipitado se lavó con 2 ml de etanol a 70% y finalmente se resuspendió en 250 μ l de Tris-HCl 2 mM pH 8.

6.7.3 Extracción para análisis de intermediarios replicativos

Para el análisis de intermediarios replicativos mediante geles bidimensionales, el ADN se aisló mediante el protocolo G2/CTAB [264]. Se partió de cultivos de 100 ml parados con azida sódica al 0,1% y enfriados en hielo. Tras centrifugar y lavar con agua, las células se resuspendieron en 2,4 ml de tampón de esferoplastos (1 M sorbitol, 100 mM EDTA, 2 mM Tris-HCl pH 8, 0,1% v/v β -mercaptoetanol, 20 U de zimoliasa/ml) y se incubaron primero a 30°C durante 20 min y posteriormente a 37°C durante 25 min. Los esferoplastos se recogieron por centrifugación y se resuspendieron cuidadosamente en 1,125 ml de solución G2 (800 mM guanidina HCl, 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 30 mM EDTA pH 8,0, 5% Tween-20, 0,5% Triton X-100). Tras resuspender las muestras, se les añadió RNasa A a 10 mg/ml y proteinasa K a 20 mg/ml y se incubaron a 50°C 35 min. Tras centrifugar a 8500 rpm 10 min a 6°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al que se añadió 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1) a temperatura ambiente, y la mezcla se homogenizó con cuidado. Tras centrifugar, el sobrenadante se mezcló con 2,5 volúmenes de solución II (1% p/v CTAB (cetil-trimetil-amonio-bromuro), 50 mM TrisHCl pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8) y se centrifugó 10 min a 8500 rpm. El precipitado se resuspendió en 1 volumen de solución III (1,4 M NaCl, 10 mM TrisHCl pH 7,6, 1 mM EDTA pH 8) y 0,2 ml de NaCl 2,5 M, y se volvió a precipitar con un volumen de isopropanol. Tras centrifugar 10 min a 13.000

rpm, el ADN precipitado se lavó con etanol 96% y se resuspendió en Tris-HCl 250 mM pH 8. Posteriormente se analizaron las muestras en geles bidimensionales (ver apartado 5.9).

6.8 Análisis de reclutamiento de proteínas al ADN mediante Corte Endógeno de Cromatina (ChEC)

El ensayo ChEC se realizó de acuerdo a [232] a partir de 50 ml de cultivo a ($D.O_{660} = 0.4-0.6$) por punto. Tras parar las células con azida sódica al 0,1%, se lavaron una vez con agua bidestilada y 3 veces con 1 ml de tampón A-PBPI (15mM Tris-HCl pH 7,4, 80 mM KCl, 2mM EDTA, 0,2 mM espermina, 0,5 mM espermidina, 1 mM PMSF, 1mM benzamidina, 10 μ g/ml quimiostatina, 10 μ g/ml pepstatina A, 10 μ g/ml hemisulfato de leupeptina). Tras los lavados, las células se resuspendieron en 600 μ l de tampón Ag-PBPI-Digitonina 0,1% (15 mM Tris-HCl pH 7,4, 80 mM KCl, 0,1 mM EGTA, 0,2 mM espermina, 0,5 mM espermidina, 1mM PMSF, 1 mM benzamidina, 10 μ g/ml quimiostatina, 10 μ g/ml pepstatina A, 10 μ g/ml hemisulfato de leupeptina, 0,1% digitonina). Tras preincubar 5 min a 30°C, se añadió $CaCl_2$ a una concentración final de 2 mM para activar la MNasa. Las reacciones se pararon a diferentes tiempos con 600 μ l de solución STOP 2X (400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 4 mM EGTA, 0,2 mg/ml glicógeno). Posteriormente se extrajo el ADN genómico total de forma estándar (ver apartado 5.7.1) y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en TAE y 0,4 mg/ml EtBr durante 80 min a 90 V. Los geles se escanearon en un aparato FujiFilm FLA 5100 y los perfiles de digestión se cuantificaron mediante el software Image Gauge de Fuji.

Para el análisis de intermediarios replicativos (ChEC/2D) se partió de 300 ml de cultivo por punto, escalando correspondientemente los volúmenes. Tras parar la reacción de la MNasa con solución de STOP, el ADN se extrajo con columnas de intercambio aniónico (ver 5.7.2) y se analizó mediante geles bidimensionales (ver 5.9).

6.9 Análisis de intermediarios replicativos en geles bidimensionales

6.9.1 Restricción de ADN

El ADN extraído se digirió durante 6 h en un volumen de 500 μ l con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII*. Transcurrido este tiempo el ADN de la reacción se precipitó con 600 μ l de isopropanol, se lavó con EtOH 70% y se resuspendió en 20 μ l de TE 1X con tampón de carga.

6.9.2 Electroforesis bidimensional

Los intermediarios replicativos se resolvieron mediante electroforesis en geles bidimensionales neutro/neutro [265]. La primera dimensión se llevó a cabo en geles de agarosa 0,4 % en TBE 1X, a temperatura ambiente y 40 V durante 22 h. El gel se tiñó con 0,34 $\mu\text{g/ml}$ de EtBr en Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 durante 30 min y se recortó la banda (aproximadamente de 10 cm) que comprendía los fragmentos de ADN entre 2,5-13 Kb. Estos fragmentos de ADN se resolvieron en la segunda dimensión a 140V durante 14 h en geles de agarosa al 1,1 % en TBE 1X con 0,34 $\mu\text{g/ml}$ de EtBr a 4°C y con recircularización del tampón. Posteriormente, los geles se transfirieron a membranas Hybond XL y los intermediarios replicativos (IRs) se detectaron mediante hibridación con sondas específicas generadas mediante PCR con los oligos ForA305ARS y RevA305ARS (sonda A) y ForOri305ARS y RevOri305ARS (sonda Ori) (oligos en Tabla 6.4).

6.10 Análisis de fragmentos de ADN por Southern blot

6.10.1 Transferencia alcalina de ácidos nucleicos a membranas

Tras separar mediante electroforesis el ADN digerido con enzimas de restricción, los geles de agarosa se incubaron en una solución de HCl 0,25 M durante 10 min tras los cuales se lavaron con agua y se trataron con solución de desnaturalización (1,25 M NaCl y 0,5 M NaOH) durante 30 min. El ADN se transfirió por capilaridad en solución de desnaturalización a una membrana de nylon Hybond XL (Amersham). Posteriormente, el ADN se fijó covalentemente a la membrana irradiándola por ambos lados con luz ultravioleta (70000 $\mu\text{J/cm}^2$), y la membrana se lavó con SCC 2X (0,03 M NaCl, 0,04 M citrato sódico pH 7).

6.10.2 Hibridación de ADN

Las membranas obtenidas en el apartado anterior se hibridaron con sondas de ADN radiactivas. Para el marcaje de las sondas con $\alpha\text{-P}^{32}\text{-dCTP}$, se mezclaron 100 ng de ADN desnaturalizado con 1 mM de hexanucleótidos de secuencias generadas al azar, una mezcla de dATP, dGTP, dTTP 0,5 mM, 25 μCi de $\text{P}^{32}\text{-dCTP}$ y 2U de ADN polimerasa Klenow. La mezcla se incubó 1 h a 37°C y los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron mediante columnas de Sephadex-G50. Las membranas se prehibridaron 30 min a 65°C en solución de hibridación (0,25 M Na_2POH_4 , 7% SDS, 1 mM EDTA pH 7,2) con agitación constante. La hibridación se realizó durante 12-16 h a 65°C incubando la membrana en la solución anterior con la sonda radiactiva previamente desnaturalizada. Tras la hibridación, el filtro se lavó dos veces con solución de lavado (0,1X SSPE, 5 mM EDTA, 0,5% SDS) a temperatura ambiente

durante 5 min, y una vez a 65°C durante 1 h. En caso necesario, las membranas se deshibridaron lavándolas 3 veces con 0,1% SDS y 0,1% SSPE a 90-100°C.

6.10.3 Cuantificación de señales

La señal radiactiva se detectó exponiendo las membranas a pantallas PhosphorImager (Fuji) que se escanearon en un analizador de radiación FujiFilm FLA 5100. La cuantificación de la señal se realizó con el software Image Gauge de Fuji.

6.11 Análisis de proteínas

6.11.1 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se llevó a cabo según [266] con las siguientes modificaciones. Las células correspondientes a 10 ml de cultivo ($D.O_{660} \approx 1$) se lavaron con agua y el pellet se congeló en nitrógeno líquido. Para la extracción, se le añadieron al pellet 200 μ l de TCA 10% frío y el mismo volumen de perlas de vidrio (Sigma) y se agitó con vórtex 7x10 segundos con intervalos de 50 segundos en hielo. Se recogió el sobrenadante, el cual se mezcló con el sobrenadante resultante de lavar las bolas con TCA 5%. Tras centrifugar, el precipitado se resuspendió en tampón Laemli 2X y el pH se neutralizó con Tris base 1M. Las muestras se incubaron 5 min a 100°C, se centrifugaron y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo.

6.12.2 Fraccionamiento de cromatina

Los fraccionamientos de cromatina se realizaron según [267] con algunas modificaciones. Las células correspondientes a 15 ml de cultivo ($D.O_{660} \approx 1$) se lavaron con solución fría 0,1 mM Tris pH 9,4 y 10 mM DTT, el pellet se resuspendió en 1 ml de la misma solución y se incubó 15 min en hielo. Posteriormente, las células se lavaron con 1 ml de tampón de esferoplastos frío (20 mM HEPES pH 7,4, 1,2 M sorbitol e inhibidores de proteasas 1x (COMPLETE EDTA free, Roche), se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón con 210 μ g de zimoliasa 20T y se incubaron 1 h a 30°C. A continuación se centrifugaron 1 min a 1000 rpm y el pellet se lavó dos veces con tampón de lavado frío (20 mM Tris pH 7,4, 20 mM KCl, 1 M sorbitol, 0,1 μ M espermina, 0,25 μ M espermidina e inhibidores de proteasas). Tras los lavados los esferoplastos se centrifugaron, se resuspendieron en tampón de rotura (20 mM Tris pH 7,4, 20 mM KCl, 1 M sorbitol, 0,1 μ M espermina, 0,25 μ M espermidina, 1% tritón X-100 e inhibidores de proteasas 1x), y se mantuvieron en hielo durante 5 min. Una vez lisadas las células, se apartaron 80 μ l de

muestra total y el resto se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 min. Tras la centrifugación se retiraron 160 µl del sobrenadante y el pellet se resuspendió en 80 µl de agua, constituyendo la fracción enriquecida en cromatina. Las fracciones total, soluble y enriquecida en cromatina se mezclaron con buffer SDS 4X en el momento (0,06 M Tris pH 6,8, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol) y se hirvieron durante 5 min.

Para el análisis por western blot se cargaron volúmenes similares para cada tiempo de la cinética. Para los controles de enriquecimiento se cargaron relaciones celulares equivalentes de las fracciones de cromatina (2 µl) y soluble (20 µl).

6.11.3 Co-inmunoprecipitación

Para estudiar la interacción entre proteínas por coimmunoprecipitación se partió de cultivos de 100 ml de células ($D.O_{660}=0,75$) que se lisaron en un Multi Beads Shocker (Yasui Kikai) a 4°C con 700 µl de NP40 tampón de lisis (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1mM PMSF, 2 mM de DTT e inhibidores de proteasas 1X (COMPLETE EDTA FREE, Roche)) y el mismo volumen de bolas de vidrio durante 40 min con pulsos de 30 seg a 3000 rpm y 30 seg de parada. A continuación se recogió el lisado y se centrifugó 5 min a 1000 g. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se volvió a repetir este paso. Tras este paso el sobrenadante se pasó a un tubo siliconizado Ultra Clear (Axygen), se añadió tampón MN (10X: 150 mM Tris HCl pH 8, 500 mM NaCl, 14 mM CaCl₂, 2 mM EDTA pH 8, 2 mM EGTA pH 8) a una concentración final 1X y 2,5 U de Micrococcal MNasa (Sigma) ó tampón benzonasa (10X: 500 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl₂) y 25 U de benzonasa (Sigma) y se incubó a 37°C durante 20 min. Tras la incubación el lisado se centrifugó a 16000 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo siliconizado. A continuación se cuantificaron las muestras para determinar la concentración de proteínas con Bradford. Se incubaron entre 12000-16000 µg de proteínas de cada muestra O/N a 4°C con 100 µl de bolas magnéticas GFP-Trap (Chromotek) al 20% en tampón de lisis (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40), reservándose entre 100-200 µg proteínas como control de carga total, la cuales se desnaturalizaron a 100°C durante 5 min tras añadirle tampón de carga Laemli 1X. Tras la incubación O/N, las bolas magnéticas se lavaron 5 veces con un 1 ml de tampón de lisis (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40), se secaron, se les añadió 40 µl de tampón de carga Laemli 1X y se desnaturalizaron a 100°C durante 5 min. Para su detección mediante western blot se cargó 20 µl de los inmunoprecipitados y 25 µg de proteína total.

6.11.4 Detección y cuantificación de proteínas mediante western blot

Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida 29:1) [261] al 8% (Mcm4-GFP, Rad51, Rad52, Rad53) ó 15 % (H4, PGK1) a 170 V durante 60-90 min. Como marcador de tamaño de proteínas se utilizó gTPbio (Bioline). Posteriormente, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare) para Mcm4-GFP, Rad51, Rad52, H4, PGK1 o PVDF (Millipore) para Rad53, mediante transferencia húmeda con el sistema Mini Trans-Blot (BioRad). La transferencia se realizó durante 1 h a 80 V (Mcm4-GFP, Rad51, Rad52, Pgc1 y H4) ó 14 h a 40 V (Rad53) en tampón de transferencia (0,025 M Tris base, 0,192 M glicina pH 8,3, 20% metanol). Para comprobar la eficiencia de la transferencia la membrana se tiñó con Ponceau S (0,1% p/v en 5% ácido acético).

Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas se trataron con solución de bloqueo (5% leche para Mcm4GFP, Rad51, Rad52, H4 y Pgc1; ó 5% de albúmina de suero bovino (BSA) para Rad53) en TBS-Tween 0,1% durante 2 h a RT y agitación suave. Posteriormente la membrana se incubó con la dilución de anticuerpo primario correspondiente (ver tabla 6.3) durante toda la noche a 4°C. A continuación las membranas se lavaron con TBS-Tween 0,1% y se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario correspondiente. Para revelar la señal se utilizó el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL Prime western blotting detector (GE Healthcare).

| NOMBRE | REFERENCIA | DESCRIPCIÓN | DILUCIÓN | SECUNDARIO |
|------------------|---------------------|---|--|--------------------|
| JL-living colors | 632381 (Clontech) | Anticuerpo monoclonal de ratón contra GFP, eGFP e YFP | 1:1000 | Antiratón 1:2000 |
| Anti-Rad51 | sc-33626 | Anticuerpo policlonal de conejo contra Rad51 | 1:400 (total) ó 1:50 (inmunoprecipitado) | Anticonejo 1:15000 |
| Anti-H4 | ab10158 | Anticuerpo policlonal de conejo contra H4 | 1:1000 | Anticonejo 1:10000 |
| Anti-PGK1 | 22C5D8 (Invitrogen) | Anticuerpo monoclonal de ratón contra Pgc1 | 1:10000 | Antiratón 1:20000 |
| Anti-Rad53 | sc- 6749 | Anticuerpo policlonal de cabra contra Rad53 | 1:300 | Anticabra 1:10000 |
| Anti-Rad52 | sc-50445 | Anticuerpo policlonal de conejo contra Rad52 | 1:100 | Anticonejo 1:10000 |

Tabla 6.3 Anticuerpos primarios

Las señales se detectaron revelando las membranas en el analizador ChemiDoc Image System. La cuantificación de la señal se realizó con el software Image Lab.

6.12 Ensayo de actividad quinasa in situ

La reacción de autofosforilación de Rad53 se llevó a cabo según [268]. Los extractos de proteínas se corrieron en un gel SDS-poliacrilamida 10% y se transfirieron a membrana de PVDF (Immobilon-P Millipore) (ver apartado 5.12.3). Seguidamente las membranas se sometieron a un protocolo de desnaturalización/renaturalización. La desnaturalización se llevó cabo en 7M guanidina-HCl, 50 mM ditioneitol (DTT), 2 mM EDTA, 50 mM TrisHCl pH 8, a temperatura ambiente durante 1 h. Las membranas se lavaron con TBS antes de la renaturalización. La renaturalización se realizó a 4°C durante 12-18 h en 2 mM EDTA, 0,04% Tween-20, 10 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 1% BSA. Posteriormente, las membranas se lavaron y equilibraron con tampón quinasa (1 mM DTT, 0,1 mM EGTA, 20 mM MgCl₂, 20 mM MnCl₂, 40 mM HEPES-NaOH pH 8, 100 μM ortovanadato de sodio). La reacción de autofosforilación se llevó a cabo incubando las membranas con 10 μCi/ml de [γ P³²]ATP en tampón quinasa durante 1 h. Por último, las membranas se lavaron sucesivamente con 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 30 mM Tris-HCl 7,5 y 0,1 % NP40, TCA 10 % y H₂O bidestilada, se secaron y expusieron a una pantalla PhosPhorImager, la cual se escaneó en un analizador de radiación FujiFilm FLA 5100.

6.13 Citometría de flujo

El análisis del contenido de ADN se llevó a cabo mediante citometría de flujo [269]. Las células se recogieron en las condiciones experimentales correspondientes, se fijaron con etanol 70%, se lavaron con PBS 1X, se resuspendieron en 100 μl de PBS con RNasa A a 100 μg/ml y se incubaron toda la noche a 37°C. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS 1X, se resuspendieron en PBS 1X con yoduro de propidio a 5 μg/ml y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente al menos 1 h. Las muestras se sonicaron durante 3 segundos con amplitud 10% y se analizaron en un FACScalibur (Becton Dickinson).

6.14 Análisis de células con gema

Para el análisis del porcentaje de células con gema las células recogidas en las condiciones experimentales correspondientes se fijaron con etanol 70%. Posteriormente se lavaron con

PBS 1X y se resuspendieron en 100 μ l de PBS 1X. Se analizaron 100 células de cada punto por observación al microscopio.

6.15 Análisis de focos de Rad52-YFP y Rfa1-YFP

Para estimar el porcentaje de células con focos de reparación, las muestras se fijaron previamente según [270]. Para ello se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó 1 min a 16000 g. El precipitado se resuspendió en 1 ml de formaldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,1 M pH 6,4 durante 10 min. Posteriormente se hicieron 2 lavados con tampón fosfato pH 6,6, se resuspendieron en tampón fosfato pH 7,4, y se guardaron a 4°C hasta el momento de su análisis al microscopio. Para la observación al microscopio, las células se permeabilizaron con etanol 80% durante 10 min, se centrifugaron y resuspendieron en DAPI 1 μ g/ml en agua bidestilada, y los focos de Rad52 o Rfa1 fusionados a proteínas fluorescentes se analizaron mediante microscopía de fluorescencia [234, 236] en un microscopio LEICA CTR6000 con el filtro L5 (λ excitación 480nm; λ emisión 527). En el caso de que la quimera Rad52-YFP no estuviera integrada en el genoma de las estirpes, las células se transformaron con el plásmido pWJ1344. El porcentaje de células con foco se determinó mediante observación directa.

6.16 Ensayos de recombinación genética

Para estudiar la frecuencia de recombinación homóloga se utilizó el sistema genético SU, el cual se basa en repeticiones invertidas de dos alelos truncados del gen *LEU2* que comparten un fragmento interno de 0,6 kb de homología [258]. Mediante recombinación entre los dos alelos truncados se genera una copia silvestre de *LEU2*. La frecuencia de recombinantes (*Leu*⁺) se determinó calculando la media de varios test de fluctuación, realizados con al menos 3 transformantes (plásmido pRS316-SU) independientes. Cada test calcula la frecuencia de recombinación con la mediana de los valores obtenidos a partir de seis colonias independientes [271]. Para ello, se realizaron las diluciones correspondientes de las células y se sembraron en placas SMM-L (para seleccionar recombinantes *Leu*⁺) y SMM-U (células totales).

6.17 Ensayos de mutagénesis

Para estudiar la tasa de mutagénesis espontánea e inducida por MMS se midió la tasa de aparición de células capaces de formar colonias en presencia de canavanina, un análogo tóxico de la arginina, que entra en la célula a través de la arginina permeasa *CAN1*. Por tanto, este

ensayo mide la aparición de mutantes de *CAN1*. La frecuencia de mutagénesis (Can^R) se determinó calculando la media de 3 tests de mutagénesis. Cada test calcula la frecuencia de mutagénesis con la mediana de los valores obtenidos a partir de seis colonias independientes (ver ensayo de recombinación genética). Para ello, se realizaron las diluciones correspondientes de las células y se sembraron en YPAD (células totales) o SMM- Arg con canavanina a 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Can^R).

6.18 PCR cuantitativa

La cantidad de ADN replicado en el origen *ARS305* se determinó mediante PCR cuantitativa (qPCR) (7500 Fast Real Time PCR System, Applied BIOSYSTEMS; 7500 System Software V1.4.0). Para ello, se mezclaron 2,5 μl de ADN genómico de cada muestra (diluido 1:25) con 12,5 μl de SYBR Green PCR master Mix (Applied Biosystems), 2,5 μl de oligonucleótidos (oligos en Tabla 5.4) a 0,1 mM y 10 μl de agua. Como recta patrón se usaron diluciones seriadas decrecientes (factor de dilución 10) de una de las muestras de ADN total.

6.19 Oligos

Los oligonucleótidos usados en esta tesis se describen en la Tabla 5.4. Los oligos “disrup” son para la construcción de estirpes con marcadores de resistencias a drogas, los “F5/R3” para el etiquetado de proteínas con GFP, los que se listan con enzimas de restricción para el clonaje de productos de PCR. Las parejas nombradas como Forw/Rev se usaron para la amplificación por PCR cuantitativa. Los oligos 305ARS son para la construcción de las sondas para el análisis de los intermediarios replicativos.

| Oligo | Secuencia |
|----------------|---|
| UP-RAD52-MN | AAGACCAAAGATCAATCCCCTGCATGCACGCAAGCCTACTCGGATC CCCGGGTTAATTAA |
| LO-RAD52-MN | AATGATGCAAATTTTTTATTTGTTTCGGCCAGGAAGCGCTTGAATTC GAGCTCGTTTAAAC |
| UP-MCM4-GFP | CGAGGGTGTAAGGAGATCAGTTCGCCTGAATAACCGTGTGGTGA CGGTGCTGGTTTA |
| LO-MCM4-GFP | TTATTAATTGTTACGCAGGGAATGATTGTAGTAGACAGCAAGCGAC CAGCATTACAT |
| UP-CDC7-XhoI | GCTAATCTCGAGCAGTAGGAAGTCTAAGTA |
| LO-CDC7-NotI | CTATGTGCGGCCGCAAGAGCATTCTTGATTCCAT |
| UP-cdc7-4-XhoI | ATTCGCTCGAGCATTGAGGAGAGGATTATGA |
| LO-cdc7-4-XbaI | TATGCTCTAGAAGCAACTGTACTCAGGGAA |
| UP-CAN1-XhoI | ATGCTACTCGAGTCAGACTTCTTAACTCCTGT |
| LO-CAN1-XbaI | ATCGTATCTAGAAAGGTAATAAAAACGTCATAT |

| | |
|---------------------|--|
| UP-rad53-disrupt | AATAGTGAGAAAAGATAGTGTTACACAACATCAACTAAAACAGCTG AAGCTTCGTACGCT |
| LO-rad53-disrupt | TTAAAAAGGGGCAGCATTCTATGGGTATTTGTCCTTGGCTAGTG GATCTGATATCATC |
| ForOri305ARS | CGCCCGACGGCCGTAA |
| RevOri305ARS | GAGCGGCCTGAAATACTGTCA |
| ForA305ARS | AAGAAAGAAAAGCATTCCAGAGACA |
| RevA305ARS | TGCTAACTGATGTGCCAAAGTCA |
| Fowori305ARS (PCRq) | CGCCCGACGGCCGTAA |
| Revori305ARS (PCRq) | GAGCGGCCTGAAATACTGTCA |
| ForwB305ARS (PCRq) | TTGTAGGTGGTAGTTCTCTTCT |
| RevB305ARS (PCRq) | TGATGGATGATGCCTTGCA |

Tabla 6.4 Oligos

7. APÉNDICES

7.1 Medios

7.1.1 Medios de bacterias

LB: 0,5% extracto de levadura, 1% bacto-triptona y 1% NaCl.

LB+Ampicilina: medio LB complementado con 75 µg/ml de ampicilina.

7.1.2 Medios de levaduras

Medio rico YPAD: 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% glucosa, 20 mg/l de adenina.

Medio rico YPAG: idéntico al medio YPAD pero la glucosa está sustituida por 2% de galactosa.

Medio sintético con glucosa (SD): 0,17% YNB (bases nitrogenadas de levadura), 0,5 % sulfato amónico, 2% glucosa.

Medio sintético con glucosa completo (SDc): medio SD complementado con los aminoácidos triptófano, histidina, metionina, leucina, lisina y con las bases nitrogenadas adenina y uracilo a las concentraciones descritas en [261].

Medio mínimo complementado (SMM): medio SD complementado con una mezcla de aminoácidos y bases [261].

Medio de esporulación (SPO): 1% acetato potásico, 0,1 % extracto de levadura, 0,05 % glucosa y complementado con los requerimientos añadidos al medio SDc a una concentración final 4 veces inferior.

7.2 Antibióticos, drogas, enzimas e inhibidores

7.2.1 Antibióticos

Ampicilina (Sigma): antibiótico β -lactámico que inhibe la división celular de *E. Coli* impidiendo la síntesis de la pared celular. Se utilizó para seleccionar cepas bacterianas con algún plásmido de interés.

G418, Geneticina (Melford): antibiótico aminoglicosídico utilizado para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* que lleven el gen de resistencia a kanamicina (*Kan*). Se utilizó a una concentración final de 200 µg/ml.

Higromicina B: antibiótico aminoglicosídico procedente de *Streptomyces hygroscopicus* que inhibe la síntesis de proteínas. Se utilizó para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* portadoras del gen de resistencia a higromicina (*Hyg*) a una concentración final de 250 µg/ml.

Nourseotricina, clonNAT (Werner bioAgents, Germany): antibiótico aminoglicosídico procedente de *Streptomyces noursei*. Se utilizó para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* portadoras del gen de resistencia a nourseotricina (*Nat*) a una concentración final de 100 µg/ml.

7.2.2 Drogas e inhibidores

1NM-PP1 (Calbiochem): inhibidor reversible y permeable a las células que compite por el sitio de unión del ATP de quinasas mutadas.

Complete EDTA free (Roche): mezcla de inhibidores de proteasas.

Nocodazol (Sigma): agente inhibidor de la polimerización de microtúbulos.

Metil Metanosulfonato (MMS): agente alquilante.

Hidroxiurea (HU) (US Biological): inhibidor de la reductasa de nucleótidos que para la replicación debido a una disminución de los niveles de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs).

PMSF (Sigma): fluoruro de fenilmetilsulfonilo, inhibidor de la polimerización de microtúbulos.

Quimostatina (Sigma): inhibidor de proteasas como quimiotripsina y catepsinas.

Hemisulfato de Leupeptina (AppliChem): inhibidor de serina y cisteína proteasas.

Benzamidina (AppliChem): inhibidor competitivo de serina proteasas y tripsinasas.

Espermina (Sigma): poliamina que ayuda a estabilizar la estructura del ADN.

Espermidina (Sigma): poliamina que ayuda estabilizar la estructura del ADN.

7.2.3 Enzimas

Enzimas de restricción (Takara): endonucleasas de ADN con dianas específicas de secuencia.

Factor α : feromona utilizada para sincronizar células de sexo a en G1.

Klenow (Promega): fragmento mayor de la ADN polimerasa I de *E. coli* con actividad polimerasa 5'-3' y exonucleasa 3'-5'.

Polimerasa termoestable de ADN: My Taq Red DNA Polymerase Boline y Velocity DNA Polymerase Boline (usada en PCRs que requieren alta fidelidad de secuencia).

Pronasa (Sigma): proteasa de *Streptomyces griseus* mezcla de tres actividades proteolíticas que incluyen las proteasas de serina.

Proteinasa K (Roche): endoproteinasa inespecífica procedente e *Pichia pastoris* capaz de degradar proteínas hasta nivel de aminoácidos.

RNasa A (Roche): endoribonucleasa específica de pirimidina que actúa sobre ARN de cadena sencilla.

Zimoliasa 20T (USB): mezcla de enzimas de *Arthrobacter luteus* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.

Nucleasa Micrococcal (Sigma): nucleasa de *Staphylococcus aureus*.

Benzonasa (Sigma): nucleasa de *Serratia marcescens* capaz de degradar todas las formas de ADN y ARN.

7.3 Tampones

Los tampones generales usados en esta tesis son:

TE 1X: 10 mM TrisHCl pH 7,5, 50 mM EDTA pH 8

TAE 1X: 0,04M Tris-Acetato, 1 mM EDTA pH 8

Tampón de carga 5X: 0,25% azul de bromofenol, 30% glicerol

TBE 1X: 0,089 M Tris Base, 0,089 M ácido bórico, 0,002 M EDTA

Laemli 1X: 0,06 M Tris pH 8, glicerol 25%, SDS 2%, bromofenol 0,01%, 0,5% v/v β -mercaptoetanol.

PBS 1X: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4

TBS 1X: 137 mM NaCl , 2,7 mM KCl, 25 mM Tris base

Tampones fosfato potásico 0,1 M

pH 6,4 27,8 mM K_2HPO_4 , 72,2 mM KH_2PO_4

pH 6,6 38,1 mM K_2HPO_4 , 61,9 mM KH_2PO_4

pH 7,4 80,2mM pH K_2HPO_4 , 19,8 mM KH_2PO_4

8. BIBLIOGRAFÍA



-
1. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. *nature*, 2001. **411**(6835): p. 366-374.
 2. Bell, S.P. and B. Stillman, *ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex*. *Nature*, 1992. **357**(6374): p. 128-34.
 3. Aparicio, O.M., D.M. Weinstein, and S.P. Bell, *Components and dynamics of DNA replication complexes in S. cerevisiae: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase*. *Cell*, 1997. **91**(1): p. 59-69.
 4. Weinreich, M., C. Liang, and B. Stillman, *The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading mcm proteins onto chromatin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(2): p. 441-6.
 5. Donovan, S., et al., *Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(11): p. 5611-6.
 6. Remus, D., et al., *Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing*. *Cell*, 2009. **139**(4): p. 719-30.
 7. Tanaka, S. and J.F. Diffley, *Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(3): p. 198-207.
 8. Davey, M.J., C. Indiani, and M. O'Donnell, *Reconstitution of the Mcm2-7 heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(7): p. 4491-9.
 9. Costa, A., et al., *The structural basis for MCM2-7 helicase activation by GINS and Cdc45*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(4): p. 471-7.
 10. Sun, J., et al., *Cryo-EM structure of a helicase loading intermediate containing ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 bound to DNA*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(8): p. 944-51.
 11. Evrin, C., et al., *A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(48): p. 20240-5.
 12. Arias, E.E. and J.C. Walter, *Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells*. *Genes Dev*, 2007. **21**(5): p. 497-518.
 13. Randell, J.C., et al., *Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase*. *Mol Cell*, 2006. **21**(1): p. 29-39.
 14. Bowers, J.L., et al., *ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication*. *Mol Cell*, 2004. **16**(6): p. 967-78.
 15. Rowles, A. and J.J. Blow, *Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication*. *Curr Opin Genet Dev*, 1997. **7**(2): p. 152-7.
 16. Deegan, T.D. and J.F. Diffley, *MCM: one ring to rule them all*. *Curr Opin Struct Biol*, 2016. **37**: p. 145-151.
 17. Fragkos, M., et al., *DNA replication origin activation in space and time*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. **16**(6): p. 360-74.
 18. Donaldson, A.D., W.L. Fangman, and B.J. Brewer, *Cdc7 is required throughout the yeast S phase to activate replication origins*. *Genes Dev*, 1998. **12**(4): p. 491-501.
 19. Bousset, K. and J.F. Diffley, *The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase*. *Genes Dev*, 1998. **12**(4): p. 480-90.
 20. Lei, M., et al., *Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis*. *Genes Dev*, 1997. **11**(24): p. 3365-74.
 21. Bruck, I. and D. Kaplan, *Dbf4-Cdc7 phosphorylation of Mcm2 is required for cell growth*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(42): p. 28823-31.
 22. Sheu, Y.J. and B. Stillman, *Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression*. *Mol Cell*, 2006. **24**(1): p. 101-13.
 23. Randell, J.C., et al., *Mec1 is one of multiple kinases that prime the Mcm2-7 helicase for phosphorylation by Cdc7*. *Mol Cell*, 2010. **40**(3): p. 353-63.
 24. Sheu, Y.J. and B. Stillman, *The Dbf4-Cdc7 kinase promotes S phase by alleviating an inhibitory activity in Mcm4*. *Nature*, 2010. **463**(7277): p. 113-7.

-
25. Sheu, Y.J., J.B. Kinney, and B. Stillman, *Concerted activities of Mcm4, Sld3 and Dbf4 in control of origin activation and DNA replication fork progression*. *Genome Res*, 2016.
 26. Sheu, Y.J., et al., *Domain within the helicase subunit Mcm4 integrates multiple kinase signals to control DNA replication initiation and fork progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(18): p. E1899-908.
 27. Bruck, I. and D.L. Kaplan, *The Dbf4-Cdc7 kinase promotes Mcm2-7 ring opening to allow for single-stranded DNA extrusion and helicase assembly*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(2): p. 1210-21.
 28. Bruck, I. and D.L. Kaplan, *Conserved mechanism for coordinating replication fork helicase assembly with phosphorylation of the helicase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(36): p. 11223-8.
 29. Stead, B.E., C.J. Brandl, and M.J. Davey, *Phosphorylation of Mcm2 modulates Mcm2-7 activity and affects the cell's response to DNA damage*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(16): p. 6998-7008.
 30. Hardy, C.F., et al., *mcm5/cdc46-bob1 bypasses the requirement for the S phase activator Cdc7p*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 3151-5.
 31. Hoang, M.L., et al., *Structural changes in Mcm5 protein bypass Cdc7-Dbf4 function and reduce replication origin efficiency in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(21): p. 7594-602.
 32. Zegerman, P. and J.F. Diffley, *Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast*. *Nature*, 2007. **445**(7125): p. 281-5.
 33. Masumoto, H., et al., *S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast*. *Nature*, 2002. **415**(6872): p. 651-5.
 34. Tanaka, S., et al., *CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast*. *Nature*, 2007. **445**(7125): p. 328-32.
 35. Devault, A., E. Gueydon, and E. Schwob, *Interplay between S-cyclin-dependent kinase and Dbf4-dependent kinase in controlling DNA replication through phosphorylation of yeast Mcm4 N-terminal domain*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(5): p. 2267-77.
 36. Ilves, I., et al., *Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins*. *Mol Cell*, 2010. **37**(2): p. 247-58.
 37. Fu, Y.V., et al., *Selective bypass of a lagging strand roadblock by the eukaryotic replicative DNA helicase*. *Cell*, 2011. **146**(6): p. 931-41.
 38. Kaplan, D.L., M.J. Davey, and M. O'Donnell, *Mcm4,6,7 uses a "pump in ring" mechanism to unwind DNA by steric exclusion and actively translocate along a duplex*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(49): p. 49171-82.
 39. Gambus, A., et al., *MCM2-7 form double hexamers at licensed origins in Xenopus egg extract*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(13): p. 11855-64.
 40. Mimura, S., et al., *Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in Xenopus egg extracts*. *Genes Cells*, 2000. **5**(6): p. 439-52.
 41. Wilmes, G.M., et al., *Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an "RXL" docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch*. *Genes Dev*, 2004. **18**(9): p. 981-91.
 42. Drury, L.S., G. Perkins, and J.F. Diffley, *The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast*. *Embo j*, 1997. **16**(19): p. 5966-76.
 43. Mimura, S., et al., *Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control*. *Nature*, 2004. **431**(7012): p. 1118-23.
 44. Labib, K., J.F. Diffley, and S.E. Kearsley, *G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(7): p. 415-22.
 45. Nguyen, V.Q., et al., *Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7*. *Curr Biol*, 2000. **10**(4): p. 195-205.

-
46. Liku, M.E., et al., *CDK phosphorylation of a novel NLS-NES module distributed between two subunits of the Mcm2-7 complex prevents chromosomal rereplication*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 5026-39.
 47. Shirayama, M., et al., *APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5*. Nature, 1999. **402**(6758): p. 203-7.
 48. Oshiro, G., et al., *Cell cycle control of Cdc7p kinase activity through regulation of Dbf4p stability*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4888-96.
 49. Mechali, M., *Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 728-38.
 50. DePamphilis, M.L., *Origins of DNA replication in metazoan chromosomes*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 1-4.
 51. Santocanale, C. and J.F. Diffley, *ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in Saccharomyces cerevisiae*. Embo j, 1996. **15**(23): p. 6671-9.
 52. Santocanale, C. and J.F. Diffley, *A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication*. Nature, 1998. **395**(6702): p. 615-8.
 53. Edwards, M.C., et al., *MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in Xenopus egg extracts*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33049-57.
 54. Harvey, K.J. and J. Newport, *Metazoan origin selection: origin recognition complex chromatin binding is regulated by CDC6 recruitment and ATP hydrolysis*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48524-8.
 55. Ivessa, A.S., et al., *The Saccharomyces cerevisiae helicase Rrm3p facilitates replication past nonhistone protein-DNA complexes*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1525-36.
 56. Lei, M., Y. Kawasaki, and B.K. Tye, *Physical interactions among Mcm proteins and effects of Mcm dosage on DNA replication in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 5081-90.
 57. Woodward, A.M., et al., *Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress*. J Cell Biol, 2006. **173**(5): p. 673-83.
 58. Ge, X.Q., D.A. Jackson, and J.J. Blow, *Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress*. Genes Dev, 2007. **21**(24): p. 3331-41.
 59. Ibarra, A., E. Schwob, and J. Mendez, *Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 8956-61.
 60. Maki, K., et al., *Abundance of prereplicative complexes (Pre-RCs) facilitates recombinational repair under replication stress in fission yeast*. J Biol Chem, 2011. **286**(48): p. 41701-10.
 61. Kornberg, R.D. and Y. Lorch, *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. Cell, 1999. **98**(3): p. 285-94.
 62. Ransom, M., B.K. Dennehey, and J.K. Tyler, *Chaperoning histones during DNA replication and repair*. Cell, 2010. **140**(2): p. 183-95.
 63. Annunziato, A.T., *Split decision: what happens to nucleosomes during DNA replication?* J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12065-8.
 64. Ellis, R.J., *Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(7): p. 395-401.
 65. Eitoku, M., et al., *Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(3): p. 414-44.
 66. Groth, A., et al., *Regulation of replication fork progression through histone supply and demand*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1928-31.

-
67. Huang, H., et al., *A unique binding mode enables MCM2 to chaperone histones H3-H4 at replication forks*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(8): p. 618-26.
 68. Tan, B.C., et al., *Functional cooperation between FACT and MCM helicase facilitates initiation of chromatin DNA replication*. Embo j, 2006. **25**(17): p. 3975-85.
 69. Franco, A.A., et al., *Histone deposition protein Asf1 maintains DNA replisome integrity and interacts with replication factor C*. Genes Dev, 2005. **19**(11): p. 1365-75.
 70. Moggs, J.G., et al., *A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(4): p. 1206-18.
 71. Ye, X., et al., *Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 341-51.
 72. Myung, K., et al., *Saccharomyces cerevisiae chromatin-assembly factors that act during DNA replication function in the maintenance of genome stability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6640-5.
 73. Latreille, D., et al., *Identification of histone 3 variant 2 interacting factors*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(6): p. 3542-50.
 74. Jasencakova, Z., et al., *Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones*. Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 736-43.
 75. Ask, K., et al., *Codanin-1, mutated in the anaemic disease CDAI, regulates Asf1 function in S-phase histone supply*. Embo j, 2012. **31**(8): p. 2013-23.
 76. Foltman, M., et al., *Eukaryotic replisome components cooperate to process histones during chromosome replication*. Cell Rep, 2013. **3**(3): p. 892-904.
 77. Mousson, F., et al., *Structural basis for the interaction of Asf1 with histone H3 and its functional implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(17): p. 5975-80.
 78. English, C.M., et al., *Structural Basis for the Histone Chaperone Activity of Asf1*. Cell, 2006. **127**(3): p. 495-508.
 79. Natsume, R., et al., *Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4*. Nature, 2007. **446**(7133): p. 338-41.
 80. Belotserkovskaya, R., et al., *FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration*. Science, 2003. **301**(5636): p. 1090-3.
 81. Winkler, D.D., et al., *Histone chaperone FACT coordinates nucleosome interaction through multiple synergistic binding events*. J Biol Chem, 2011. **286**(48): p. 41883-92.
 82. Stuwe, T., et al., *The FACT Spt16 "peptidase" domain is a histone H3-H4 binding module*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 8884-9.
 83. Myers, C.N., et al., *Mutant versions of the S. cerevisiae transcription elongation factor Spt16 define regions of Spt16 that functionally interact with histone H3*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20847.
 84. Jamai, A., A. Puglisi, and M. Strubin, *Histone chaperone spt16 promotes redeposition of the original h3-h4 histones evicted by elongating RNA polymerase*. Mol Cell, 2009. **35**(3): p. 377-83.
 85. Han, J., et al., *Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication*. Science, 2007. **315**(5812): p. 653-5.
 86. Li, Q., et al., *Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly*. Cell, 2008. **134**(2): p. 244-55.
 87. Han, J., et al., *A Cul4 E3 ubiquitin ligase regulates histone hand-off during nucleosome assembly*. Cell, 2013. **155**(4): p. 817-29.
 88. Gerard, A., et al., *The replication kinase Cdc7-Dbf4 promotes the interaction of the p150 subunit of chromatin assembly factor 1 with proliferating cell nuclear antigen*. EMBO Rep, 2006. **7**(8): p. 817-23.
 89. Huang, S., et al., *Rtt106p is a histone chaperone involved in heterochromatin-mediated silencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13410-5.
 90. Huang, S., et al., *A novel role for histone chaperones CAF-1 and Rtt106p in heterochromatin silencing*. Embo j, 2007. **26**(9): p. 2274-83.

-
91. Yang, J., et al., *The Histone Chaperone FACT Contributes to DNA Replication-Coupled Nucleosome Assembly*. Cell Rep, 2016.
 92. Tyler, J.K., et al., *The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair*. Nature, 1999. **402**(6761): p. 555-60.
 93. Putnam, C.D., E.J. Jaehnig, and R.D. Kolodner, *Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in Saccharomyces cerevisiae*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(9): p. 974-82.
 94. Weinert, T.A. and L.H. Hartwell, *The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae*. Science, 1988. **241**(4863): p. 317-22.
 95. Siede, W., A.S. Friedberg, and E.C. Friedberg, *RAD9-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 7985-9.
 96. Friedel, A.M., B.L. Pike, and S.M. Gasser, *ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 237-44.
 97. Grenon, M., C. Gilbert, and N.F. Lowndes, *Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(9): p. 844-7.
 98. Lengsfeld, B.M., et al., *Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex*. Mol Cell, 2007. **28**(4): p. 638-51.
 99. Gravel, S., et al., *DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection*. Genes Dev, 2008. **22**(20): p. 2767-72.
 100. Mimitou, E.P. and L.S. Symington, *Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 770-4.
 101. Zhu, Z., et al., *Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends*. Cell, 2008. **134**(6): p. 981-94.
 102. Alani, E., et al., *Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein*. J Mol Biol, 1992. **227**(1): p. 54-71.
 103. Zou, L. and S.J. Elledge, *Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1542-8.
 104. Melo, J.A., J. Cohen, and D.P. Toczyski, *Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo*. Genes Dev, 2001. **15**(21): p. 2809-21.
 105. Harrison, J.C. and J.E. Haber, *Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint*. Annu Rev Genet, 2006. **40**: p. 209-35.
 106. Hammet, A., et al., *Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast*. EMBO Rep, 2007. **8**(9): p. 851-7.
 107. Emili, A., *Mec1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 183-9.
 108. Agarwal, R., et al., *Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 45027-33.
 109. Clarke, D.J., et al., *S-phase checkpoint controls mitosis via an APC-independent Cdc20p function*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(10): p. 928-35.
 110. Solomon, M.J., et al., *Cyclin activation of p34cdc2*. Cell, 1990. **63**(5): p. 1013-24.
 111. Palou, G., et al., *Three Different Pathways Prevent Chromosome Segregation in the Presence of DNA Damage or Replication Stress in Budding Yeast*. PLoS Genet, 2015. **11**(9): p. e1005468.
 112. Jaehnig, E.J., et al., *Checkpoint kinases regulate a global network of transcription factors in response to DNA damage*. Cell Rep, 2013. **4**(1): p. 174-88.
 113. Zhao, X., E.G. Muller, and R. Rothstein, *A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 329-40.

-
114. Zhao, X., et al., *The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage*. The EMBO Journal, 2001. **20**(13): p. 3544-3553.
 115. Baroni, E., et al., *The functions of budding yeast Sae2 in the DNA damage response require Mec1- and Tel1-dependent phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4151-65.
 116. Flott, S., et al., *Regulation of Rad51 function by phosphorylation*. EMBO Rep, 2011. **12**(8): p. 833-9.
 117. Bashkirov, V.I., et al., *DNA damage-induced phosphorylation of Rad55 protein as a sentinel for DNA damage checkpoint activation in S. cerevisiae*. Methods Enzymol, 2006. **409**: p. 166-82.
 118. Herzberg, K., et al., *Phosphorylation of Rad55 on serines 2, 8, and 14 is required for efficient homologous recombination in the recovery of stalled replication forks*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8396-409.
 119. Tercero, J.A., M.P. Longhese, and J.F. Diffley, *A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response*. Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1323-36.
 120. Bonilla, C.Y., J.A. Melo, and D.P. Toczyski, *Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA damage checkpoint in the absence of damage*. Mol Cell, 2008. **30**(3): p. 267-76.
 121. Sanchez, Y., et al., *Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways*. Science, 1996. **271**(5247): p. 357-60.
 122. Morrow, D.M., et al., *TEL1, an S. cerevisiae homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1*. Cell, 1995. **82**(5): p. 831-40.
 123. Alcasabas, A.A., et al., *Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(11): p. 958-65.
 124. Osborn, A.J. and S.J. Elledge, *Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53*. Genes Dev, 2003. **17**(14): p. 1755-67.
 125. Tanaka, K. and P. Russell, *Mrc1 channels the DNA replication arrest signal to checkpoint kinase Cds1*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(11): p. 966-72.
 126. Bando, M., et al., *Csm3, Tof1, and Mrc1 form a heterotrimeric mediator complex that associates with DNA replication forks*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34355-65.
 127. Lou, H., et al., *Mrc1 and DNA polymerase epsilon function together in linking DNA replication and the S phase checkpoint*. Mol Cell, 2008. **32**(1): p. 106-17.
 128. Komata, M., et al., *The direct binding of Mrc1, a checkpoint mediator, to Mcm6, a replication helicase, is essential for the replication checkpoint against methyl methanesulfonate-induced stress*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(18): p. 5008-19.
 129. Katou, Y., et al., *S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex*. Nature, 2003. **424**(6952): p. 1078-83.
 130. Murakami, H. and S. Keeney, *Temporospatial coordination of meiotic DNA replication and recombination via DDK recruitment to replisomes*. Cell, 2014. **158**(4): p. 861-73.
 131. Matsumoto, S., et al., *Hsk1-Dfp1/Him1, the Cdc7-Dbf4 kinase in Schizosaccharomyces pombe, associates with Swi1, a component of the replication fork protection complex*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42536-42.
 132. Sommariva, E., et al., *Schizosaccharomyces pombe Swi1, Swi3, and Hsk1 are components of a novel S-phase response pathway to alkylation damage*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2770-84.
 133. Kim, J.M., et al., *Cdc7 kinase mediates Claspin phosphorylation in DNA replication checkpoint*. Oncogene, 2008. **27**(24): p. 3475-82.
 134. Tenca, P., et al., *Cdc7 is an active kinase in human cancer cells undergoing replication stress*. J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 208-15.

-
135. Matsumoto, S., et al., *Hsk1 kinase and Cdc45 regulate replication stress-induced checkpoint responses in fission yeast*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(23): p. 4627-37.
 136. Furuya, K., et al., *DDK phosphorylates checkpoint clamp component Rad9 and promotes its release from damaged chromatin*. *Mol Cell*, 2010. **40**(4): p. 606-18.
 137. Tsuji, T., et al., *The role of Dbf4/Drf1-dependent kinase Cdc7 in DNA-damage checkpoint control*. *Mol Cell*, 2008. **32**(6): p. 862-9.
 138. Lee, A.Y., et al., *Dbf4 is direct downstream target of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) protein to regulate intra-S-phase checkpoint*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(4): p. 2531-43.
 139. Takeda, T., et al., *Regulation of initiation of S phase, replication checkpoint signaling, and maintenance of mitotic chromosome structures during S phase by Hsk1 kinase in the fission yeast*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(5): p. 1257-74.
 140. Desany, B.A., et al., *Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway*. *Genes Dev*, 1998. **12**(18): p. 2956-70.
 141. Tercero, J.A. and J.F. Diffley, *Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint*. *Nature*, 2001. **412**(6846): p. 553-7.
 142. Sogo, J.M., M. Lopes, and M. Foiani, *Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects*. *Science*, 2002. **297**(5581): p. 599-602.
 143. Hustedt, N., S.M. Gasser, and K. Shimada, *Replication checkpoint: tuning and coordination of replication forks in s phase*. *Genes (Basel)*, 2013. **4**(3): p. 388-434.
 144. Segurado, M. and J.F. Diffley, *Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks*. *Genes Dev*, 2008. **22**(13): p. 1816-27.
 145. Morin, I., et al., *Checkpoint-dependent phosphorylation of Exo1 modulates the DNA damage response*. *The EMBO Journal*, 2008. **27**(18): p. 2400-2410.
 146. Hu, J., et al., *The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing*. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1221-32.
 147. Kai, M., et al., *Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress*. *Genes Dev*, 2005. **19**(8): p. 919-32.
 148. Meister, P., et al., *Temporal separation of replication and recombination requires the intra-S checkpoint*. *J Cell Biol*, 2005. **168**(4): p. 537-44.
 149. Hashimoto, Y., et al., *Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(11): p. 1305-11.
 150. Schlacher, K., et al., *Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11*. *Cell*, 2011. **145**(4): p. 529-42.
 151. Bjergbaek, L., et al., *Mechanistically distinct roles for Sgs1p in checkpoint activation and replication fork maintenance*. *Embo j*, 2005. **24**(2): p. 405-17.
 152. Cobb, J.A., et al., *DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1*. *Embo j*, 2003. **22**(16): p. 4325-36.
 153. De Piccoli, G., et al., *Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases*. *Mol Cell*, 2012. **45**(5): p. 696-704.
 154. Ilves, I., N. Tamberg, and M.R. Botchan, *Checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibits the activity of the Cdc45/MCM2-7/GINS (CMG) replicative helicase complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(33): p. 13163-70.
 155. Trenz, K., A. Errico, and V. Costanzo, *Ptx1 is required for chromosomal DNA replication under stressful conditions*. *Embo j*, 2008. **27**(6): p. 876-85.
 156. Dungrawala, H., et al., *The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability*. *Mol Cell*, 2015. **59**(6): p. 998-1010.
 157. Yekezare, M., B. Gomez-Gonzalez, and J.F. Diffley, *Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 6): p. 1297-306.
 158. McIntosh, D. and J.J. Blow, *Dormant origins, the licensing checkpoint, and the response to replicative stresses*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(10).

-
159. Santocanale, C., K. Sharma, and J.F. Diffley, *Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast*. Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2360-4.
 160. Aparicio, O.M., *Location, location, location: it's all in the timing for replication origins*. Genes Dev, 2013. **27**(2): p. 117-28.
 161. Zegerman, P. and J.F. Diffley, *Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation*. Nature, 2010. **467**(7314): p. 474-8.
 162. Lopez-Mosqueda, J., et al., *Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing*. Nature, 2010. **467**(7314): p. 479-83.
 163. Weinreich, M. and B. Stillman, *Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway*. Embo j, 1999. **18**(19): p. 5334-46.
 164. Yamada, M., H. Masai, and J. Bartek, *Regulation and roles of Cdc7 kinase under replication stress*. Cell Cycle, 2014. **13**(12): p. 1859-66.
 165. Yamada, M., et al., *ATR-Chk1-APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress*. Genes Dev, 2013. **27**(22): p. 2459-72.
 166. Kunkel, T.A. and D.A. Erie, *DNA mismatch repair**. Annu. Rev. Biochem., 2005. **74**: p. 681-710.
 167. Jiricny, J., *The multifaceted mismatch-repair system*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006. **7**(5): p. 335-346.
 168. Lindahl, T. and D. Barnes. *Repair of endogenous DNA damage*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2000. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 169. Sancar, A. and J.T. Reardon, *Nucleotide excision repair in E. coli and man*. Advances in protein chemistry, 2004. **69**: p. 43-71.
 170. Caldecott, K.W., *Single-strand break repair and genetic disease*. Nature Reviews Genetics, 2008. **9**(8): p. 619-631.
 171. West, S.C., *Molecular views of recombination proteins and their control*. Nature reviews Molecular cell biology, 2003. **4**(6): p. 435-445.
 172. Sugiyama, T., J.H. New, and S.C. Kowalczykowski, *DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6049-54.
 173. Song, B. and P. Sung, *Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 15895-904.
 174. Sung, P., et al., *Rad51 recombinase and recombination mediators*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 42729-32.
 175. Heyer, W.D., K.T. Ehmsen, and J. Liu, *Regulation of homologous recombination in eukaryotes*. Annu Rev Genet, 2010. **44**: p. 113-39.
 176. Fabre, F., et al., *Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/ Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16887-92.
 177. Krejci, L., et al., *DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 305-9.
 178. Mankouri, H.W., H.P. Ngo, and I.D. Hickson, *Shu proteins promote the formation of homologous recombination intermediates that are processed by Sgs1-Rmi1-Top3*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(10): p. 4062-73.
 179. Prakash, R., et al., *Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination*. Genes Dev, 2009. **23**(1): p. 67-79.
 180. Krejci, L., et al., *Homologous recombination and its regulation*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(13): p. 5795-818.
 181. Strathern, J.N., B.K. Shafer, and C.B. McGill, *DNA synthesis errors associated with double-strand-break repair*. Genetics, 1995. **140**(3): p. 965-72.

-
182. Hicks, W.M., M. Kim, and J.E. Haber, *Increased mutagenesis and unique mutation signature associated with mitotic gene conversion*. *Science*, 2010. **329**(5987): p. 82-5.
183. Deem, A., et al., *Break-induced replication is highly inaccurate*. *PLoS Biol*, 2011. **9**(2): p. e1000594.
184. Myung, K., et al., *SGS1, the Saccharomyces cerevisiae homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 113-6.
185. Wu, L. and I.D. Hickson, *The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination*. *Nature*, 2003. **426**(6968): p. 870-4.
186. Prado, F., *Genetic instability is prevented by Mrc1-dependent spatio-temporal separation of replicative and repair activities of homologous recombination: homologous recombination tolerates replicative stress by Mrc1-regulated replication and repair activities operating at S and G2 in distinct subnuclear compartments*. *Bioessays*, 2014. **36**(5): p. 451-62.
187. Huertas, P., *DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(1): p. 11-6.
188. Alabert, C., J.N. Bianco, and P. Pasero, *Differential regulation of homologous recombination at DNA breaks and replication forks by the Mrc1 branch of the S-phase checkpoint*. *Embo j*, 2009. **28**(8): p. 1131-41.
189. Gonzalez-Prieto, R., et al., *Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance*. *EMBO J*, 2013. **32**(9): p. 1307-21.
190. Prado, F., *Homologous recombination maintenance of genome integrity during DNA damage tolerance*. *Molecular and Cellular Oncology*, 2014. **1**(2).
191. Hedglin, M. and S.J. Benkovic, *Regulation of Rad6/Rad18 Activity During DNA Damage Tolerance*. *Annu Rev Biophys*, 2015. **44**: p. 207-28.
192. Sale, J.E., A.R. Lehmann, and R. Woodgate, *Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(3): p. 141-52.
193. Branzei, D. and M. Foiani, *Template Switching: From Replication Fork Repair to Genome Rearrangements*. *Cell*, 2007. **131**(7): p. 1228-1230.
194. Huang, D., B.D. Piening, and A.G. Paulovich, *The preference for error-free or error-prone postreplication repair in Saccharomyces cerevisiae exposed to low-dose methyl methanesulfonate is cell cycle dependent*. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(8): p. 1515-27.
195. Hishida, T., et al., *RAD6-RAD18-RAD5-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light*. *Nature*, 2009. **457**(7229): p. 612-5.
196. Hoegge, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. *Nature*, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
197. Brandão, L.N., et al., *The Role of Dbf4-Dependent Protein Kinase in DNA Polymerase ζ -Dependent Mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2014. **197**(4): p. 1111-1122.
198. Day, T.A., et al., *Phosphorylated Rad18 directs DNA polymerase eta to sites of stalled replication*. *J Cell Biol*, 2010. **191**(5): p. 953-66.
199. Vaziri, C. and H. Masai, *Integrating DNA replication with trans-lesion synthesis via Cdc7*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(24): p. 4818-23.
200. Lopes, M., M. Foiani, and J.M. Sogo, *Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions*. *Mol Cell*, 2006. **21**(1): p. 15-27.
201. Kawamoto, T., et al., *Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis*. *Mol Cell*, 2005. **20**(5): p. 793-9.
202. Elvers, I., et al., *UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(16): p. 7049-57.
203. Callegari, A.J., et al., *Postreplication gaps at UV lesions are signals for checkpoint activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(18): p. 8219-24.

-
204. Karras, G.I. and S. Jentsch, *The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase*. *Cell*, 2010. **141**(2): p. 255-67.
205. Daigaku, Y., A.A. Davies, and H.D. Ulrich, *Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication*. *Nature*, 2010. **465**(7300): p. 951-5.
206. Baynton, K., A. Bresson-Roy, and R.P. Fuchs, *Analysis of damage tolerance pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: a requirement for Rev3 DNA polymerase in translesion synthesis*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(2): p. 960-6.
207. Stelter, P. and H.D. Ulrich, *Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation*. *Nature*, 2003. **425**(6954): p. 188-91.
208. Prakash, L., *Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations*. *Mol Gen Genet*, 1981. **184**(3): p. 471-8.
209. Zhang, H. and C.W. Lawrence, *The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(44): p. 15954-9.
210. Liberi, G., et al., *Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in sgs1 mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase*. *Genes Dev*, 2005. **19**(3): p. 339-50.
211. Branzei, D. and M. Foiani, *Regulation of DNA repair throughout the cell cycle*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(4): p. 297-308.
212. Minca, E.C. and D. Kowalski, *Multiple Rad5 activities mediate sister chromatid recombination to bypass DNA damage at stalled replication forks*. *Mol Cell*, 2010. **38**(5): p. 649-61.
213. Ortiz-Bazan, M.A., et al., *Rad5 plays a major role in the cellular response to DNA damage during chromosome replication*. *Cell Rep*, 2014. **9**(2): p. 460-8.
214. Vazquez, M.V., V. Rojas, and J.A. Tercero, *Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA*. *DNA Repair (Amst)*, 2008. **7**(10): p. 1693-704.
215. Henry-Mowatt, J., et al., *XRCC3 and Rad51 modulate replication fork progression on damaged vertebrate chromosomes*. *Mol Cell*, 2003. **11**(4): p. 1109-17.
216. Petermann, E., et al., *Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair*. *Mol Cell*, 2010. **37**(4): p. 492-502.
217. Gangavarapu, V., S. Prakash, and L. Prakash, *Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae**. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(21): p. 7758-64.
218. Papouli, E., et al., *Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p*. *Mol Cell*, 2005. **19**(1): p. 123-33.
219. Pfander, B., et al., *SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase*. *Nature*, 2005. **436**(7049): p. 428-33.
220. Karras, G.I., et al., *Noncanonical role of the 9-1-1 clamp in the error-free DNA damage tolerance pathway*. *Mol Cell*, 2013. **49**(3): p. 536-46.
221. Barlow, J.H. and R. Rothstein, *Rad52 recruitment is DNA replication independent and regulated by Cdc28 and the Mec1 kinase*. *EMBO J*, 2009. **28**(8): p. 1121-30.
222. Bailis, J.M., et al., *Minichromosome maintenance proteins interact with checkpoint and recombination proteins to promote s-phase genome stability*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(5): p. 1724-38.
223. Shukla, A., et al., *Interaction of hRad51 and hRad52 with MCM complex: a cross-talk between recombination and replication proteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **329**(4): p. 1240-5.

-
224. Prakash, L. and S. Prakash, *Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1977. **86**(1): p. 33-55.
225. Labib, K., *How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells?* Genes Dev, 2010. **24**(12): p. 1208-19.
226. Wan, L., et al., *Chemical inactivation of cdc7 kinase in budding yeast results in a reversible arrest that allows efficient cell synchronization prior to meiotic recombination*. Genetics, 2006. **174**(4): p. 1767-74.
227. Masai, H., T. Miyake, and K. Arai, *hsk1+, a Schizosaccharomyces pombe gene related to Saccharomyces cerevisiae CDC7, is required for chromosomal replication*. Embo j, 1995. **14**(13): p. 3094-104.
228. Brown, G.W. and T.J. Kelly, *Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 22083-90.
229. Liang, C. and B. Stillman, *Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in cdc6 mutants*. Genes Dev, 1997. **11**(24): p. 3375-86.
230. Tanaka, T., D. Knapp, and K. Nasmyth, *Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs*. Cell, 1997. **90**(4): p. 649-60.
231. Jackson, A.L., et al., *Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein kinase by association with the Dbf4 protein*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(5): p. 2899-908.
232. Schmid, M., T. Durussel, and U.K. Laemmli, *ChIC and ChEC; genomic mapping of chromatin proteins*. Mol Cell, 2004. **16**(1): p. 147-57.
233. Clemente-Ruiz, M., R. Gonzalez-Prieto, and F. Prado, *Histone H3K56 acetylation, CAF1, and Rtt106 coordinate nucleosome assembly and stability of advancing replication forks*. PLoS Genet, 2011. **7**(11): p. e1002376.
234. Lisby, M., et al., *Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins*. Cell, 2004. **118**(6): p. 699-713.
235. Lisby, M., U.H. Mortensen, and R. Rothstein, *Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(6): p. 572-7.
236. Lisby, M., R. Rothstein, and U.H. Mortensen, *Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8276-82.
237. Wurtele, H., et al., *Histone H3 lysine 56 acetylation and the response to DNA replication fork damage*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(1): p. 154-72.
238. Masumoto, H., et al., *A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response*. Nature, 2005. **436**(7048): p. 294-8.
239. Chen, C.C., et al., *Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair*. Cell, 2008. **134**(2): p. 231-43.
240. Duro, E., et al., *Budding yeast Mms22 and Mms1 regulate homologous recombination induced by replisome blockage*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(5): p. 811-8.
241. Luciano, P., et al., *Replisome function during replicative stress is modulated by histone h3 lysine 56 acetylation through Ctf4*. Genetics, 2015. **199**(4): p. 1047-63.
242. Buser, R., et al., *The Replisome-Coupled E3 Ubiquitin Ligase Rtt101Mms22 Counteracts Mrc1 Function to Tolerate Genotoxic Stress*. PLoS Genet, 2016. **12**(2): p. e1005843.
243. Clement, C. and G. Almouzni, *MCM2 binding to histones H3-H4 and ASF1 supports a tetramer-to-dimer model for histone inheritance at the replication fork*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(8): p. 587-9.
244. Emili, A., et al., *Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1*. Mol Cell, 2001. **7**(1): p. 13-20.
245. Hu, F., A.A. Alcasabas, and S.J. Elledge, *Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly*. Genes Dev, 2001. **15**(9): p. 1061-6.
246. Jiao, Y., et al., *Surprising complexity of the Asf1 histone chaperone-Rad53 kinase interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(8): p. 2866-71.

-
247. Chuang, L.C., et al., *Phosphorylation of Mcm2 by Cdc7 promotes pre-replication complex assembly during cell-cycle re-entry*. Mol Cell, 2009. **35**(2): p. 206-16.
248. Sung, P., *Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28194-7.
249. Sung, P. and H. Klein, *Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(10): p. 739-50.
250. Pessoa-Brandao, L. and R.A. Scalfani, *CDC7/DBF4 functions in the translesion synthesis branch of the RAD6 epistasis group in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2004. **167**(4): p. 1597-610.
251. Branzei, D., F. Vanoli, and M. Foiani, *SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 915-20.
252. Brandao, L.N., et al., *The role of Dbf4-dependent protein kinase in DNA polymerase zeta-dependent mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2014. **197**(4): p. 1111-22.
253. Liang, D., et al., *Histone dosage regulates DNA damage sensitivity in a checkpoint-independent manner by the homologous recombination pathway*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(19): p. 9604-20.
254. Gunjan, A. and A. Verreault, *A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in S. cerevisiae*. Cell, 2003. **115**(5): p. 537-49.
255. Longtine, M.S., et al., *Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1998. **14**(10): p. 953-61.
256. Hanahan, D. and M. Meselson, *Plasmid screening at high colony density*. Gene, 1980. **10**(1): p. 63-7.
257. Sheff, M.A. and K.S. Thorn, *Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2004. **21**(8): p. 661-70.
258. Prado, F., et al., *Mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 2003. **42**(4): p. 185-98.
259. Wach, A., et al., *New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1994. **10**(13): p. 1793-808.
260. Goldstein, A.L. and J.H. McCusker, *Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1999. **15**(14): p. 1541-53.
261. Amberg, D.C., Burke, D. J., and Strathern, J., *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. 2005: Cold Spring Harbor.
262. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, 1990. **96**(1): p. 23-8.
263. Bolivar, F. and K. Backman, *Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors*. Methods Enzymol, 1979. **68**: p. 245-67.
264. Lundin, C., et al., *Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(12): p. 3799-811.
265. Brewer, B.J. and W.L. Fangman, *The localization of replication origins on ARS plasmids in S. cerevisiae*. Cell, 1987. **51**(3): p. 463-71.
266. Foiani, M., et al., *The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in Saccharomyces cerevisiae executes an essential function at the initial stage of DNA replication*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 923-33.
267. Feser, J., et al., *Elevated histone expression promotes life span extension*. Mol Cell, 2010. **39**(5): p. 724-35.
268. Pelliccioli, A., et al., *Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6561-72.
269. Corliss, D.A. and W.E. White, Jr., *Fluorescence of yeast vitally stained with ethidium bromide and propidium iodide*. J Histochem Cytochem, 1981. **29**(1): p. 45-8.

-
270. Monje-Casas, F., et al., *Kinetochore orientation during meiosis is controlled by Aurora B and the monopolin complex*. *Cell*, 2007. **128**(3): p. 477-90.
271. Prado, F. and A. Aguilera, *Role of reciprocal exchange, one-ended invasion crossover and single-strand annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: different requirements for the RAD1, RAD10, and RAD52 genes*. *Genetics*, 1995. **139**(1): p. 109-23.